

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 196 36 889 A 1

51 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
C 07 K 14/79  
C 07 K 14/76  
A 61 K 38/40  
A 61 K 38/38

21 Aktenzeichen: 196 36 889.8  
22 Anmeldetag: 11. 9. 96  
43 Offenlegungstag: 12. 3. 98

DE 196 36 889 A 1

71 Anmelder:  
Kratz, Felix, Dr., 79232 March, DE

72 Erfinder:  
gleich Anmelder

56 Entgegenhaltungen:  
DE 41 22 210 A 1

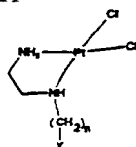
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Antineoplastisch wirkende Transferrin- und Albuminkonjugate zytostatischer Verbindungen aus der Gruppe der Anthrazykline, Alkylantien, Antimetabolite und Cisplatin-Analoga und diese enthaltende Arzneimittel

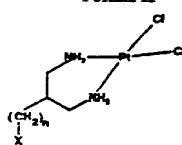
57 Transferrin- und Albuminkonjugate, bestehend aus thio-  
liertem Transferrin und/oder Albumin und durch Maleinimid-  
verbindungen derivatisierten zytostatischen Verbindungen  
aus der Gruppe der Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubi-  
cin, Epirubicin, Idarubicin), der Alkylantien (Chlorambucil,  
Melphalan), der Antimetabolite (5-Fluorouracil, 5'-Deoxy-  
5-fluorouridin) oder aus einem derivatisierten Cisplatin-Ana-  
logon der allgemeinen Formel I, II oder III,

Ester-, Imin-, Hydrazon-, Acylhydrazon-, Urethan-, Acetal-  
oder Ketalbindung erfolgen kann, zeigen eine hohe tumor-  
hemmende Wirksamkeit, sind sehr gut wasserlöslich und  
unter physiologischen Bedingungen stabile Formulierungen.  
Sie sind deshalb für die Behandlung von Krebskrankheiten  
sehr geeignet.

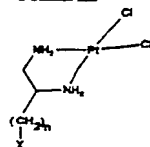
Formel I



Formel II



Formel III



n = 0-6, X = -NH<sub>2</sub>, -OH, -O-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COCR\*, -NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COCR\*  
R\* = H, Phenyl, Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffatomen

wobei die chemische Verknüpfung zwischen Maleinimidver-  
bindung und zytostatischer Verbindung durch eine Amid-,

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01.98 702 071/528

17/25

## Beschreibung

## Gebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft die Herstellung von zytotoxischen Chemoimmunokonjugaten bestehend aus einem geeigneten Trägersystem und zytostatischen Verbindungen für die Behandlung von Krebserkrankungen.

Immunokonjugate sind Verbindungen, die aus einer geeigneten Trägersubstanz, wie z. B. Antikörpern, Wachstumsfaktoren oder hormon- bzw. peptidähnlichen Strukturen, und einem oder mehreren zytotoxischen Wirkstoffen, wie z. B. Zytostatika, Toxinen oder radioaktiven Isotopen, bestehen. Die Trägersubstanzen besitzen in der Regel die Eigenschaft, sich bevorzugt im Tumorgewebe anzureichern, so daß auf diesem Wege ebenso der an die Trägersubstanz gebundene Wirkstoff im Tumorgewebe angereichert und somit eine selektivere antitumorale Therapie erzielt wird. Chemoimmunokonjugate bezeichnen Konjugate von Trägersubstanzen und zytostatischen Verbindungen.

## Stand der Technik

Die zur Zeit klinisch eingesetzten Zytostatika gegen Krebserkrankungen besitzen eine Reihe von schweren systemischen Nebenwirkungen und weisen keine Anreicherung im Tumorgewebe auf, so daß nach neuen Derivaten bzw. Formulierungen geforscht wird, die eine selektivere antitumorale Therapie ermöglichen. Zu diesem Zwecke werden Chemoimmunokonjugate bestehend aus einem geeigneten Trägerprotein und Zytostatika entwickelt.

Als Trägerproteine kommen unter anderem Antikörper, Wachstumsfaktoren, Serumproteine oder hormon- bzw. peptidähnliche Strukturen in Frage, für die in der Regel eine Anreicherung im Tumorgewebe bekannt ist (Mägerstädt, M.: Antibody Conjugates and Malignant Disease, Library of Congress 1990; Chadwick, C.M.: Receptors in Tumour Biology, Cambridge University Press, 1984). Die vorliegende Erfindung umfaßt solche Trägerproteine, insbesondere humanes Serumtransferrin und Serumalbumin, deren Anreicherung im Tumorgewebe in der Literatur dokumentiert ist (Ward, S.G. Taylor, R.C.: 1—54, in Metal-Based Drugs (Gielen, M.F. (Ed.)), Freund Publishing House Ltd, 1988; Babson, A.L., Winnick, T. (1954): Protein transfer in tumor-bearing rats, Cancer Res. 14, 606—611, Sinn, H., Schrenk, H.H., Friedrich, A., Schilling, U. und Maier-Borst, W. (1990): Design of compounds having an enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier. Part 1, Nucl. Med. Biol. Vol. 17 (8), 819—827).

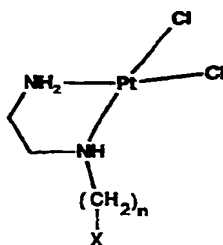
Die Herstellung von Chemoimmunokonjugaten erfolgt grundsätzlich entweder durch direkte Kopplung von Trägersubstanz und Wirkstoff oder mit Hilfe von Spacergruppen, sog. homo- bzw. heterobifunktionelle Reagenzien. Vorwiegend ist bisher das Verfahren der direkten Kopplung angewandt worden, welches jedoch häufig zu polymeren Produkten und nicht eindeutig definierten Konjugaten führt. Kürzlich sind einige Chemoimmunokonjugate (Europäische Patentanmeldung, EP 91-117535 911615, Europäische Patentanmeldung, EP 90-109268 900516, PCT Internationale Patentanmeldung, WO 90-CA251 900809, Britische (UK) Patentanmeldung, GB 83-5104 830224 und Europäische Patentanmeldung, EP 89-102370 890210), die mittels bestimmter bifunktioneller Reagenzien hergestellt wurden, als zytostatisch wirkende Mittel vorgeschlagen worden.

## Beschreibung der Erfindung

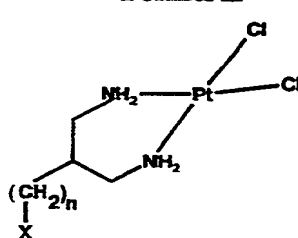
Es wurde nun gefunden, daß Transferrin- und Albuminkonjugate, bestehend aus thioliertem Transferrin oder Albumin und mindestens einer durch Maleinimidverbindungen derivatisierten ozytostatischen Verbindung, eine der zytostatischen Verbindung gleichwertige oder höhere tumorhemmende Wirksamkeit aufweisen.

Für die Herstellung dieser Chemoimmunokonjugate sind zytostatische Verbindungen geeignet, wie die Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin oder Idarubicin, die Alkylantien Chlorambucil oder Melphalan, die Antimetabolite 5-Fluorouracil bzw. 5'-Deoxy-5-fluorouridin oder derivatisierte Cisplatin-Analoga der allgemeinen Formel I, II bzw. III,

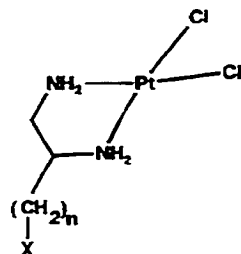
Formel I



Formel II



Formel III



$$n = 0-6, X = -NH_2, -OH, -O-CO-(CH_2)_n-COR^*, -NH-CO-(CH_2)_n-COR^*$$

$$R^* = H, \text{ Phenyl, Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffatomen}$$

die mit einer Maleinimidverbindung derivatisiert wurden. Die zytostatischen Verbindungen werden dabei in der Regel mit einer aliphatischen bzw. aromatischen Maleinimidverbindung umgesetzt, die mindestens eine für die Bindung zum Zytostatikum geeignete funktionelle Gruppe besitzt, wie eine Amino-, Hydroxy-, Carbonsäure-, Carbonsäurechlorid-, Sulfonsäure-, Sulfonsäurechlorid-, Säurehydrazid- oder Hydrazinogruppen, Oxycarbonylchlorid-, Aldehyd-, Keto-, so daß Maleinimiddervate von zytostatischen Verbindungen bereitgestellt werden, wobei die chemische Verknüpfung zwischen Maleinimidverbindung und zytostatischer Verbindung durch eine Amid-, Ester-, Imin-, Hydrazon-, Acylhydrazon-, Oxycarbonyl-, Acetal-, oder Ketalbindung erfolgt.

Durch Umsetzen der derivatisierten zytostatischen Verbindungen mit thiolisiertem Transferrin und Albumin werden Chemoimmunokonjugate bereitgestellt, die einfach und effektiv hergestellt werden, die eine hohe Reinheit besitzen, die eine im Vergleich zu mehreren der ursprünglichen zytostatischen Verbindungen ausgezeichnete Wasserlöslichkeit besitzen, die in physiologischem Puffer stabile Formulierungen sind und die eine in vitro antiproliferative Wirksamkeit gegen menschliche Tumorzellen aufweisen, die denen der ungebundenen Zytostatika gleichwertig oder überlegen ist.

Die durch solche Kopplungen realisierten Chemoimmunokonjugate, die für eine selektivere Behandlung von Krebserkrankungen sehr geeignet sind, sind Gegenstand der Erfindung und werden im folgenden beschrieben.

Das Verfahren zur Synthese der Chemoimmunokonjugate erfolgt in vier Schritten:

Schritt 1: Synthese von Maleinimidverbindungen

Schritt 2: Synthese von Maleinimiddervaten zytostatischer Verbindungen

Schritt 3: Thiolierung des Trägerproteins

Schritt 4: Kopplung der zytostatischen Verbindung an das thiolierte Trägerprotein.

#### Schritt 1: Synthese von Maleinimidverbindungen

Die Maleiniridverbindungen werden im allgemeinen nach einem der zwei folgenden Verfahren hergestellt: Beim ersten Verfahren wird Maleinsäureanhydrid mit einer aliphatischen Aminoverbindung  $H_2N-R-Y$ , wobei R eine aliphatische C-Kette mit 1-6 Kohlenstoffatomen oder eine substituierte bzw. unsubstituierte Benzylgruppe und  $Y = -OH, -COOH, -SO_3H, -CH(OC_2H_5)_2, R^*-C=O, R^* = \text{Phenyl oder Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen}$  ist, zur entsprechenden Maleaminsäure und anschließend mit einem bis zwei Äquivalenten Triethylamin in wasserfreiem Toluol unter azeotroper Entfernung des entstehenden Wassers zur entsprechenden Maleinimidverbindung umgesetzt. Die weitere Derivatisierung der Gruppe Y erfolgt durch Umsetzen der  $COOH-$  bzw.  $SO_3H-$  Gruppe mit Oxalylchlorid oder Thionylchlorid zu den entsprechenden Säurechloriden, durch Umsetzen der Hydroxygruppe mit Bis-(trichlormethyl)-carbonat zu den entsprechenden Oxycarbonylchloriden, durch Umsetzen der Acetalgruppe  $-CH(OC_2H_5)_2$  zu den entsprechenden Aldehyden mit Hilfe von säurekatalytischer Spaltung, wie z. B. durch p-Toluolsulfonsäure, Schwefelsäure oder saures Kieselgel, und durch Umsetzen der Säurechloride mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-alkoholamin bzw. N-(tert-Butoxycarbonyl)-alkoholhydrazin und anschließender Spaltung mit Trifluoressigsäure oder Chlorwasserstoff in Ether, Tetrahydrofuran oder Dioxan zu den entsprechenden Amino- bzw. Hydrazinoverbindungen.

Beim zweiten Verfahren wird Maleinsäureanhydrid mit einer aromatischen Aminoverbindung  $H_2N-R-Y$ , wobei R eine substituierte bzw. unsubstituierte Phenylengruppe und  $Y = -OH, -COOH, -SO_3H, R^*-C=O, R^* = \text{Phenyl oder Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen}$  ist, zur entsprechenden Maleaminsäure und anschließend mit Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Natriumacetat zur entsprechenden Maleinimidverbindung umgesetzt. Die weitere Derivatisierung der Gruppe Y erfolgt durch Umsetzen der  $COOH-$  bzw.  $SO_3H-$  Gruppe mit Oxalylchlorid oder mit Thionylchlorid zu den entsprechenden Säurechloriden, durch Umsetzen der Hydroxygruppe mit Bis-(trichlormethyl)-carbonat zu den entsprechenden Oxycarbonylchloriden, durch Umsetzen der Säurechloride zu den entsprechenden Aldehyden mit Hilfe von  $LiAl[OC(CH_3)_3]_3H$  in Tetrahydrofuran, durch Umsetzen der Säurechloride in Tetrahydrofuran oder Ethylacetat mit t-Butylcarbazat und anschließender Spaltung mit Trifluoressigsäure oder Chlorwasserstoff in Ether, Tetrahydrofuran oder Dioxan zu den entsprechenden Säurehydraziden und durch Umsetzen der Säurechloride mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-alkoholamin bzw. N-(tert-Butoxycarbonyl)-alkoholhydrazin und anschließender Spaltung mit Trifluoressigsäure oder Chlorwasserstoff in Ether, Tetrahydrofuran oder Dioxan zu den entsprechenden Amino bzw. Hydrazinoverbindungen.

Die Bismaleinimidverbindungen der allgemeinen Formel V, die aus den in Anspruch 2 genannten Maleinimid-

verbindungen bestehen, wobei zwei Maleinimidverbindungen durch eine Gruppe Z verbunden sind, die eine Diaminoalkan-, Dihydroxyalkan-, Dihydrazinoalkan- oder Carbonsäuredihydrazid-Verbindung darstellt, so daß zwei Maleinimidverbindungen über zwei Amid-, Ester-, Imin-, Hydrazon oder Acylhydrazonbindungen miteinander verbunden sind, werden aus den unter Anspruch 1 genannten Maleinimidverbindungen hergestellt, wobei die Synthese der durch Amidbindungen verknüpften Verbindungen durch Umsetzen der Säurechloride der Maleinimidverbindungen mit Diaminoalkanverbindungen  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ ,  $n = 2-12$ , in Tetrahydrofuran oder Ethylacetat unter eventuellem Zusatz von Triethylamin erfolgt, die Synthese der durch eine Esterbindung verknüpften Verbindungen durch Umsetzen der Säurechloride der Maleinimidverbindungen mit Dihydroxyverbindungen  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ ,  $n = 2-12$ , in Tetrahydrofuran oder Ethylacetat unter eventuellem Zusatz von Triethylamin erfolgt, die Synthese der durch eine Iminbindung verknüpften Verbindungen durch Umsetzen der Aldehyde oder Ketone der Maleinimidverbindungen mit Diaminoalkanverbindungen  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ ,  $n = 2-12$ , in wasserfreiem Tetrahydrofuran, Methanol oder Ethanol unter Zusatz einer katalytischen Menge von p-Toluolsulfonsäure oder Trifluoressigsäure erfolgt und die Synthese der durch eine Hydrazon- bzw. Acylhydrazonbindung verknüpften Verbindungen durch Umsetzen der Aldehyde oder Ketone der Maleinimidverbindungen mit Dihydrazinoalkanverbindungen  $\text{NH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{NH}_2$  bzw. Carbonsäuredihydraziden  $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$ ,  $n = 2-12$ , in wasserfreiem Tetrahydrofuran, Methanol oder Ethanol unter Zusatz einer katalytischen Menge von p-Toluolsulfonsäure oder Trifluoressigsäure erfolgt.

## Schritt 2: Maleinimidverbindungen zytostatischer Verbindungen

Für die Umsetzung mit den aus Schritt 1 erhaltenen Maleinimidverbindungen sind die in Anspruch 1 genannten zytostatischen Verbindungen geeignet.

Diese zytostatischen Verbindungen werden mit den unter Anspruch 1 genannten und im 1. Schritt erläuterten Maleinimidverbindungen umgesetzt, so daß Maleinimiderivate von zytostatischen Verbindungen bereitgestellt werden, wobei die chemische Verknüpfung zwischen Maleinimidverbindung und zytostatischer Verbindung durch eine Amid-, Ester-, Imin-, Hydrazon-, Acyl- bzw. Benzoylhydrazon-, Acetal- oder Ketalbindung erfolgt.

Bei den Anthrazyklinen Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin oder Idarubicin erfolgt die Synthese im einzelnen durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Säurechloride der Maleinimidverbindungen zu den entsprechenden Anthrazyklin-Maleinimiderivaten in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid oder Tetrahydrofuran unter eventuellem Zusatz einer tertiären Base, in der Regel Triethylamin, wobei die Kopplung über die 3'- $\text{NH}_2$ -Gruppe des Aminozuckers des Anthrazyklins als Amidbindung erfolgt, durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Aldehyden bzw. Ketonen der Maleinimidverbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid, Methanol oder Ethanol, unter eventuellem Zusatz einer katalytischen Menge einer Säure, in der Regel p-Toluolsulfonsäure bzw. Trifluoressigsäure, wobei die Kopplung über die 3'- $\text{NH}_2$ -Gruppe des Aminozuckers des Anthrazyklins als Iminbindung erfolgt, oder durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Aminen der Maleinimidverbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid, Methanol oder Ethanol, unter Zusatz einer katalytischen Menge einer Säure, in der Regel p-Toluolsulfonsäure bzw. Trifluoressigsäure, wobei die Kopplung über die  $\text{C}_{13}$ -Ketoposition des Anthrazyklins als Iminbindung erfolgt, oder durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Säurehydraziden der Maleinimidverbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid, Methanol oder Ethanol, unter Zusatz einer katalytischen Menge einer Säure, in der Regel p-Toluolsulfonsäure bzw. Trifluoressigsäure, wobei die Kopplung über die  $\text{C}_{13}$ -Ketoposition des Anthrazyklins als Alkylsulfonyl- oder Phenylsulfonylhydrazonbindung bzw. als Phenylalkoyl- oder Benzoylhydrazonbindung erfolgt.

Bei den Alkylantien Chlorambucil und Melphalan erfolgt die Synthese im einzelnen durch Umsetzen von Chlorambucil bzw. Melphalan mit den unter Schritt 1 aufgeführten Hydroxymaleinimidverbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dichlormethan oder Tetrahydrofuran unter Zusatz von Dimethylaminopyridin und einem Kondensationsmittel, in der Regel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat, zu den entsprechenden Chlorambucil- bzw. Melphalan-Maleinimiderivaten, wobei die Kopplung über die  $\text{COOH}$ -Gruppe von Chlorambucil bzw. Melphalan als Esterbindung erfolgt, oder durch Umsetzen von Chlorambucil bzw. Melphalan mit Säurehalogenierungsreagenzien, wie z. B. Oxalylchlorid oder Thionylchlorid, zu den entsprechenden Säurechloriden und anschließend Umsetzen der Säurechloride in Tetrahydrofuran oder Ethylacetat mit t-Alkylcarbazaten, in der Regel t-Butylcarbazat, und anschließender Spaltung mit Säuren, in der Regel Trifluoressigsäure oder Chlorwasserstoff in Ether, Tetrahydrofuran oder Dioxan, zu den entsprechenden Säurehydraziden von Chlorambucil bzw. Melphalan, die nun wiederum mit einem der in Schritt 1 aufgeführten Aldehyden oder Ketonen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid, Methanol oder Ethanol, unter Zusatz einer katalytischen Menge einer Säure, in der Regel Trifluoressigsäure oder p-Toluolsulfonsäure, zu den entsprechenden Maleinimida-acylhydrazon Derivaten von Chlorambucil bzw. Melphalan umgesetzt werden.

Bei 5-Fluorouracil erfolgt die Synthese im einzelnen durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Säurechloriden der Maleinimidverbindungen zu den entsprechenden Maleinimiderivaten von 5-Fluorouracil in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Tetrahydrofuran, unter eventuellem Zusatz einer tertiären Base, in der Regel Triethylamin, wobei die Kopplung über die 1'- oder 3'- $\text{NH}$ -Gruppe von 5-Fluorouracil als Säureamidbindung erfolgt, oder durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Oxycarbonylchloriden der Maleinimidverbindungen zu den entsprechenden Maleinimiderivaten von 5-Fluorouracil in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Tetrahydrofuran unter eventuellem Zusatz einer tertiären Base, in der Regel Triethylamin, wobei die Kopplung über die 1'- oder 3'- $\text{NH}$ -Gruppe von 5-Fluorouracil als Oxycarbonylbindung erfolgt, oder durch Umsetzen von 5-Fluorouracil mit Formaldehyd und den unter Schritt 1 aufgeführten

Carbonsäuren oder Sulfonsäuren zu den entsprechenden Maleinimidderivaten von 5-Fluorouracil in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dichlormethan oder Tetrahydrofuran, unter Zusatz von Dimethylaminopyridin und einem Kondensationsmittel, in der Regel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat, wobei die Kopplung über die 1'- oder 3'-NH-Gruppe von 5-Fluorouracil als Carbamoyloxymethylbindung erfolgt.

Bei 5'-Deoxy-5-fluorouridin erfolgt die Synthese im einzelnen durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Säurechloriden der Maleinimidverbindungen zu den entsprechenden Maleinimidderivaten von 5'-Deoxy-5-fluorouridin in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Tetrahydrofuran, unter eventuellem Zusatz einer tertiären Base, in der Regel Triethylamin, wobei die Kopplung über die 2'-HO- oder 3'-HO-Gruppe von 5'-Deoxy-5-fluorouridin als Esterbindung erfolgt, oder durch Umsetzen mit den unter Schritt 1 aufgeführten Aldehyden oder Ketonen der Maleinimidverbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Tetrahydrofuran, Methanol oder Ethanol, unter Zusatz einer katalytischen Menge einer Säure, in der Regel Trifluoressigsäure oder p-Toluolsulfonsäure, wobei die Kopplung über die 2'-HO- und 3'-HO-Gruppe von 5'-Deoxy-5-fluorouridin als Acetal- bzw. Ketalbindung erfolgt.

Bei den Maleinimidderivaten der Cisplatin-Analoga der allgemeinen Formel I, II und III erfolgt die Synthese im einzelnen durch Umsetzen der entsprechenden Aminverbindungen  $H_2N-CH_2CH_2-NH-(CH_2)_n-X$ ,  $(H_2N-CH_2)_2CH-(CH_2)_nX$  oder  $H_2N-CH_2CH(NH_2)-(CH_2)_n-X$ , wobei eine oder zwei der primären bzw. sekundären Aminogruppen mit einer BOC-Gruppe geschützt worden sein kann (Umsetzung mit Bis-tert.-butyloxycarbonylanhydrid), mit den unter Schritt 1 aufgeführten Säuren oder Säurechloriden der Maleinimidverbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Tetrahydrofuran oder Ethylacetat, unter eventuellem Zusatz einer tertiären Base, in der Regel Triethylamin, oder unter eventuellem Zusatz von Dimethylaminopyridin und einem Kondensationsmittel, in der Regel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat, zu den entsprechenden BOC-geschützten Maleinimidestern bzw. Maleinimidsäureamiden, die nun durch ein Ether/HCl-Gemisch unter Abspaltung der BOC-Gruppe in die entsprechenden Hydrochloride und schließlich durch Umsetzen mit Kaliumtetrachloroplatinat(II) in einem geeigneten Lösungsmittel, in der Regel THF/Wasser-Gemische, in die entsprechenden Platin(II)-Komplexe übergeführt werden, wobei die Kopplung über die endständige HO-Gruppe des jeweiligen Cisplatin-Analogons der Formel I, II oder III als Esterbindung oder über die endständige  $H_2N$ -Gruppe des jeweiligen Cisplatin-Analogons der Formel I, II oder III als Säureamidbindung erfolgt, oder durch Umsetzen der entsprechenden Aminverbindungen  $H_2N-CH_2CH_2-NH-(CH_2)_n-X$ ,  $(H_2N-CH_2)_2CH-(CH_2)_n-X$  oder  $H_2N-CH_2CH(NH_2)-(CH_2)_n-X$ , wobei eine oder zwei der primären bzw. sekundären Aminogruppen mit einer BOC-Gruppe geschützt worden sein kann (Umsetzung mit Bis-tert.-butyloxycarbonylanhydrid), mit Verbindungen des Typs  $HOOC-(CH_2)_n-CO-CR^*$  ( $R^* = H, Phenyl, Alkyl$  mit 1–6 Kohlenstoffatomen) in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Tetrahydrofuran oder Ethylacetat, unter eventuellem Zusatz einer tertiären Base, in der Regel Triethylamin, oder unter eventuellem Zusatz von Dimethylaminopyridin und einem Kondensationsmittel, in der Regel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat, zu den entsprechenden BOC-geschützten Maleinimidestern bzw. Maleinimidsäureamiden, die nun eine weitere Carbonylfunktion enthalten, die im folgenden mit einem der in Schritt 1 aufgeführten Aminen, Säurehydraziden oder Hydrazinen in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid, Methanol oder Ethanol, unter Zusatz einer katalytischen Menge einer Säure, in der Regel p-Toluolsulfonsäure oder Trifluoressigsäure, zu den entsprechenden Maleinimidimin-, Maleinimidacylhydrazon oder Maleinimidhydrazon-Derivaten umgesetzt werden, die nun wiederum durch ein Ether/HCl-Gemisch unter Abspaltung der BOC-Gruppe in die entsprechenden Hydrochloride und schließlich durch Umsetzen mit Kaliumtetrachloroplatinat(II) in einem geeigneten Lösungsmittel, in der Regel THF/Wasser-Gemische, in die entsprechenden Platin(II)-Komplexe übergeführt werden.

Die Isolierung der oben genannten Maleinimidderivate der zytostatischen Verbindungen erfolgt entweder durch Kristallisation, durch Kieselgelsäulenchromatographie oder durch präparative HPLC bzw. FPLC auf einer reverse phase(C18)- oder Diol-Säule, wie in den untenstehenden Beispielen beschrieben.

### Schritt 3: Thiolierung des Trägerproteins

Sulphydrylgruppen (HS-Gruppen) werden durch Umsetzen des Trägerproteins mit einem geeigneten Thiolierungsreagenz, vorzugsweise Iminoethiolan, in humanes Serumtransferrin und Serumalbumin, eingeführt.

Die Thiolierung erfolgt in einem Salzpuffer, in der Regel in 0,1 M Natriumborat, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA — pH = 8,0, mit einem Überschuß an Thiolierungsreagenz (10- bis 100-facher Überschuß) und anschließender Gelfiltration (beispielsweise Sephadex G10 oder G25) mit einem Salzpuffer, in der Regel 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl — pH 6,8–7,5. Die Konzentration an Protein nach erfolgter Gelfiltration wird durch die Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt und liegt in der Regel zwischen  $0,1-4,0 \times 10^{-4}$  M. Die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen wird mit Ellmann's Reagenz bei 412 nm bestimmt. Durch Variation der Reaktionsbedingungen können im Mittel 1 bis 30 HS-Gruppen eingeführt werden. Die thiolierte Transferrin- bzw. Albuminlösung wird direkt für die Synthese der Konjugate eingesetzt.

### Schritt 4: Kopplung der zytostatischen Maleinimidverbindungen an das thiolierte Trägerprotein

Die zytostatischen Maleinimidderivate (s. Schritt 2) werden mit thioliertem Transferrin oder Albumin (s. Schritt 3) bei Raumtemperatur umgesetzt. Dabei wird zu dem thiolierten Protein, das sich in einem Salzpuffer, in der Regel 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl — pH 6,8–7,5, befindetet, ein 1,5- bis 10-facher Überschuß der zytostatischen Maleinimidderivats (bezogen auf die Anzahl der vorhandenen HS-Gruppen im Protein), gelöst in

einer minimalen Menge Lösemittel, in der Regel Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Ethanol, Methanol, Acetonitril oder Tetrahydrofuran (etwa 1–10% des Volumens der thiolierten Probe), gegeben. Nach etwa 5–20 Minuten wird die Lösung zentrifugiert, und das gebildete Chemoimmunokonjugat wird durch anschließende Gelfiltration (beispielsweise Sephadex G10 oder G25) in einem Salzpuffer, in der Regel 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl – pH 6,8–7,5, vom überschüssigen zytostatischen Maleinimidderivat abgetrennt. Es kann vorteilhaft sein, die thiolierte Proteinlösung vor Zugabe des Maleinimidderivats mit einem Salzpuffer zu verdünnen, so daß die Proteinkonzentration etwa  $0,01\text{--}0,1 \times 10^{-4}$  M beträgt, das Maleinimidderivat, gelöst in einer minimalen Menge Lösemittel, zuzugeben und anschließend nach etwa 5–20 Minuten die Lösung mit einem handelsüblichen Konzentrator aufzukonzentrieren und das Chemoimmunokonjugat, wie oben beschrieben, zu isolieren.

Die Anzahl der an das Trägerprotein gebundenen zytostatischen Maleinimidderivate, die über die HS-Gruppen des Proteins zur Maleinimidgruppe in Form einer resultierenden Thioetherbindung gekoppelt sind, erfolgt entweder durch eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei der absorbierenden Wellenlänge des zytostatischen Maleinimidderivats (typischerweise zwischen 280 und 500 nm) oder durch eine colorimetrische Bestimmung, die bei den Konjugaten von Chlorambucil und Melphalan mit Hilfe des NBP Tests (Epstein, J. Rosenthal, KW, Ess, R.J. Anal. Chem. 1955, 27, 1435–1439), bei den Konjugaten von 5-Fluorouracil und 5-Deoxy-5-fluorouridin mit Hilfe eines Assays nach Habib (Habib, S.T., Talanta 1981, 28, 685–87) und bei den Konjugaten der Cisplatinanaloga mit Hilfe einer Bestimmung nach Gonias und Pizzo (Genias, S.L., Pizzo, S.V. J. Biol. Chem. 1982, 258, 5764–5769) erfolgt.

Im Mittel werden auf dem oben beschriebenen Weg etwa 1–30 Moleküle der zytostatischen Verbindung an ein Molekül Protein gebunden.

Die Reinheit der Chemoimmunokonjugate wird durch HPLC mit Hilfe einer analytischen Bio-Sil SEC 250, (300 mm  $\times$  7,8 mm) von Bio-RAD, mobile Phase: id.R. 0,15 M NaCl, 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  – pH 7,0 geprüft. Dabei besitzen die Transferrin- und Albuminkonjugate eine Reinheit von > 90%.

Die Chemoimmunokonjugate können in gefrorener Form bei  $T = -20^\circ\text{C}$  bzw.  $-78^\circ\text{C}$  gelagert werden. Des weiteren ist es möglich, die Lösung der Chemoimmunokonjugate zu lyophilisieren und das Lyophilisat bei  $+5$  bis  $-78^\circ\text{C}$  zu lagern.

Gegenstand der Erfindung sind auch solche Chemoimmunokonjugate bestehend aus Albumin, das gemäß Ansprüchen 1 bis 5 mit etwa zehn bis dreißig Äquivalenten einer zytostatischen Verbindung beladen ist und mit einem Protein, beispielsweise mit Transferrin oder mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen ein tumorassoziiertes Antigen gerichtet ist, vorzugsweise aber mit Transferrin, über eine der unter Anspruch 6 genannten Bismaleinimidverbindungen oder einer aliphatischen bzw. aromatischen Bismaleinimidverbindung konjugiert ist.

Dabei werden etwa 80–90% der in Albumin eingeführten Thiolgruppen mit dem zytostatischen Maleinimidderivat, gelöst in einer minimalen Menge Lösemittel, in der Regel Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Ethanol, Methanol, Acetonitril oder Tetrahydrofuran (etwa 1–10% des Volumens der thiolierten Probe), umgesetzt und nach etwa 5–20 Minuten ein 1,5- bis 10-facher Überschuß der Bismaleinimidverbindung, gelöst in einer minimalen Menge Lösemittel, in der Regel Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Ethanol, Methanol, Acetonitril oder Tetrahydrofuran (etwa 1–10% des Volumens der thiolierten Probe), zugegeben. Nach etwa 10–20 Minuten wird die Lösung zentrifugiert, und das gebildete Chemoimmunokonjugat wird durch anschließende Gelfiltration (beispielsweise Sephadex G10 oder G25) in einem Salzpuffer, in der Regel 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl – pH 6,8–7,5, von dem zytostatischen Maleinimidderivat und der Bismaleinimidverbindung abgetrennt. Anschließend wird das so modifizierte Albuminkonjugat mit einem der oben genannten Proteine, welches im Mittel 1,5 Thiolgruppen enthält, umgesetzt und das resultierende Chemoimmunokonjugat, das nun aus einem mit zytostatischen Verbindungen beladenen Albuminmolekül und dem oben genannten Protein besteht, mit Hilfe einer Superdex-200-Säule (Fa. Pharmacia) oder einer Hydroxylapatitsäule (Fa. Pharmacia oder Bio-Rad) in einem Salzpuffer, in der Regel 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl – pH 6,8–7,5, isoliert.

Es ist auch möglich, zunächst eines der oben genannten Proteine, welches im Mittel 1,5 Thiolgruppen enthält, mit einem 1,5- bis 10-fachen Überschuß der Bismaleinimidverbindung umzusetzen und das gebildete Proteinkonjugat durch anschließende Gelfiltration (beispielsweise Sephadex G10 oder G25) in einem Salzpuffer, in der Regel 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl – pH 6,8–7,5, von der Bismaleinimidverbindung abzutrennen, und anschließend das so modifizierte Proteinkonjugat, das nun im Mittel 1,5 Äquivalente der Bismaleinimidverbindung enthält, mit modifiziertem Albuminkonjugat umzusetzen, wobei etwa 80–90% der in Albumin eingeführten Thiolgruppen mit einem zytostatischen Maleinimidderivat bereits umgesetzt wurden. Das resultierende Chemoimmunokonjugat, das nun aus einem mit zytostatischen Verbindungen beladenen Albuminmolekül und dem oben genannten Protein besteht, wird mit Hilfe einer Superdex-200-Säule (Fa. Pharmacia) oder einer Hydroxylapatitsäule (Fa. Pharmacia oder Bio-Rad) in einem Salzpuffer, in der Regel 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl – pH 6,8–7,5, isoliert.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher, ohne sie einzuschränken.

#### Ausführungsbeispiele

##### Schritt 1: Synthese von Maleinimidverbindungen

##### m-Maleinimidphenol

In einem Dreihalskolben wurden 300 ml Aceton vorgelegt. Dann wurden 98,06 g (1,0 mol) Maleinsäureanhydrid in 200 ml Aceton und 109,13 g (1,0 mol) m-Aminophenol in einer Mischung aus 200 ml Aceton und 50 ml

Methanol gelöst. Beide Lösungen wurden gleichzeitig dem vorgelegten Aceton zugetropft. Nach etwa 1 h begann im Kolben die Abscheidung eines gelben Feststoffs. Nach Ende der Zugabe wurde der Ansatz 90 Minuten lang weitergerührt, dann auf +4°C abgekühlt und der Niederschlag abgesaugt. Dieser wurde mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 86%). 5,0 g (24,6 mmol) N-(m-Hydroxyphenyl)-maleinsäureamid wurden in 350 ml Toluol suspendiert und unter Rückfluß erhitzt. In der Wärme wurden 2,53 g (3,48 ml, 25,0 mmol) Triethylamin zugegeben und während 2 h am Wasserabscheider erhitzt. Es wurde vom entstandenen roten Öl abdekantiert und das Toluol im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 1/1; Ausbeute: 12% gelbes Pulver); Schmelzpunkt: 135°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,35 (Essigester/Hexan 1/1)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 66,32%; H: 3,90%; N: 7,73%;

(C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>) gefunden: C: 65,65%; H: 3,98%; N: 7,37%.

#### p-Maleinimidobenzophenon

14,0 g (70 mmol) p-Aminobenzophenon wurden in 70 ml Aceton gelöst. 7,0 g (70 mmol) Maleinsäureanhydrid wurden in 40 ml Aceton gelöst und über einen Zeitraum von 15 Minuten bei Raumtemperatur zugetropft. Nach 30 Minuten begann die Ausfällung eines gelben Niederschlags. Der Ansatz wurde 3 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet (Ausbeute: 93%). 19,3 g (65,4 mmol) N-(p-Benzophenyl)-maleinsäureamid und 2,6 g (31,0 mmol) wasserfreies Natriumacetat wurden bei 55°C in 50 ml Essigsäureanhydrid gelöst und bei dieser Temperatur 2 h lang gerührt. Anschließend wurde das Essigsäureanhydrid bei 60°C im Wasserstrahlvakuum entfernt. Zum Rückstand wurden 300 ml Wasser zugegeben und 2 h lang bei 70°C gerührt. Der während dieser Zeit ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Aceton umkristallisiert (Ausbeute: 94% gelber Feststoff); Schmelzpunkt: 150°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,70 (Essigester/Hexan 6/1)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 73,64%; H: 3,97%; N: 5,05%;

(C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) gefunden: C: 73,15%; H: 3,96%; N: 5,00%.

#### 2-Maleinimidoethansulfonsäure

12,52 g (100 mmol) p-Aminophenylessigsäure wurden in 250 ml Dimethylformamid suspendiert und in der Wärme in Lösung gebracht. 9,8 g (100 mmol) Maleinsäureanhydrid wurden in 100 ml Dimethylformamid gelöst und während 60 Minuten in die vorher auf unter 40°C abgekühlte Lösung zugetropft. Etwa 60 Minuten nach Beendigung des Zutropfens setzte die Ausfällung eines Niederschlags ein. Es wurde weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Dimethylformamid, Aceton und Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 52%). 4,46 g (20 mmol) N-(2-Ethyl)maleinsulfonsäureamid wurden in 1 l Toluol suspendiert und zum Rückfluß erhitzt. In der Wärme wurden 4,04 g (40 mmol) Triethylamin zugegeben und anschließend 2 h lang unter Rückfluß am Wasserabscheider erhitzt. Dann wurde vom entstandenen Öl abdekantiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 100 ml Wasser aufgenommen und mit 1 M HCl auf pH = 2 eingestellt. Die saure Lösung wurde mit Essigester extrahiert (6 × 50 ml). Die vereinigten Essigester-Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde aus Ethanol umkristallisiert (Ausbeute: 40% weiße Kristalle); Schmelzpunkt: 188°C; R<sub>f</sub>-Wert:

0,35 (Ethanol/Ethylacetat 2/1)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 35,12%; H: 3,41%; N: 6,83%; S 15,61%;

(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S) gefunden: C: 35,00%; H: 3,43%; N: 6,59%; S 15,01.

#### p-Maleinimidophenylessigsäure

25,0 g (166,9 mmol) p-Aminophenylessigsäure wurden in 250 ml Methanol suspendiert und in der Wärme unter Zugabe von 500 ml Aceton in Lösung gebracht. 19,25 g (166,9 mmol) Maleinsäureanhydrid wurden in 100 ml Aceton gelöst und während 60 Minuten in die vorher auf unter 40°C abgekühlte Lösung zugetropft. Der Ansatz wurde 60 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf etwa 300 ml eingeeengt und bei -20°C kaltgestellt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 82%). 18,0 g (72 mmol) N-(4-Essigsäurephenyl)maleinsäureamid wurden in 2,4 l Toluol suspendiert und zum Rückfluß erhitzt. In der Wärme wurden 14,7 g (20,2 ml, 144 mmol) Triethylamin zugegeben und anschließend 2 h lang unter Rückfluß am Wasserabscheider erhitzt. Dann wurde vom entstandenen roten Öl abdekantiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 300 ml Wasser aufgenommen und mit 1 M HCl auf pH = 2 eingestellt.

Die saure Lösung wurde mit Essigester extrahiert (6 × 50 ml). Die vereinigten Essigester-Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde aus Essigester/Hexan umkristallisiert (Ausbeute: 51% gelbe Kristalle); Schmelzpunkt: 158°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,45 (Essigester/Methanol 2/1)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 62,34%; H: 3,92%; N: 6,09%;

(C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>) gefunden: C: 61,84%; H: 4,43%; N: 5,59%.

## p-Maleinimidophenyllessigsäurechlorid

1,0 g (4,33 mmol) p-Maleinimidophenyllessigsäure wurden in 25 ml Dichlormethan suspendiert und mit einem 2,5-fachen Überschuß an Oxalsäuredichlorid (1,37 g, 945 µl; 10,82 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Feuchtigkeitsausschluß auf 30–40°C erwärmt und 15 h lang gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch im Hochvakuum getrocknet. Kristallisation aus Toluol lieferte ein gelbes Pulver (Ausbeute: 59%); Schmelzpunkt: 154°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,29 (Essigester/Hexan 4/1)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 58,91%; H: 3,30%; N: 5,75%; Cl: 14,49%;

(C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>Cl) gefunden: C: 60,61%; H: 3,64%; N: 5,13%; Cl: 13,80%.

## m-Maleinimidobenzoessäure-2-aminoethylester HCl

500 mg (479 µl; 3,10 mmol) N-(tert.-Butoxycarbonyl)-ethanolamin wurden unter Rühren bei Raumtemperatur in 10 ml Essigester gelöst und mit 472 mg (650 µl; 4,65 mmol) Triethylamin versetzt. Nun wurden 1,1 g (4,65 mmol) m-Maleinimidobenzoessäurechlorid, gelöst in 30 ml Essigester, innerhalb von 30 Minuten zutropft. Nach Ende des Zutropfens wurde der Ansatz 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde von den ausgefallenen Salzen abfiltriert und die Lösung 3 mal mit je 20 ml Wasser extrahiert. Die Essigesterphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 1/1;

Ausbeute: 49% gelber Sirup); R<sub>f</sub>-Wert: 0,27 (Essigester/Hexan 1/1). 8,0 g (22,2 mmol) m-Maleinimidobenzoessäure-2-[N-(tert.-butoxycarbonyl)]-aminoethylester wurden in 70 ml einer 1 molaren Lösung von HCl in absolutem Ether gelöst und bei Raumtemperatur 15 h lang gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt, mit absolutem Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 42%); Schmelzpunkt: Zersetzung > 84°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,14 (Essigester/Methanol 1/2)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 52,61%; H: 4,38%; N: 9,44%;

(C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cl) gefunden: C: 51,09%; H: 4,02%; N: 8,68%.

## m-Maleinirnidobenzoessäure-2-hydrazinoethylester 2 HCl

6,0 g (5,3 ml; 78,8 mmol) 2-Hydroxyethylhydrazin in 30 ml Dichlormethan wurden bei Raumtemperatur in einem Kolben vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 15,46 g (70,92 mmol) Di-tert.-butyl-dicarbonat, gelöst in 30 ml Dichlormethan, unter Rühren zutropft und 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 ml Ether aufgenommen. Die Etherphase wurde 5 mal mit je 50 ml Wasser extrahiert. Die Etherphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und der Ether im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 4/1; Ausbeute: 20% weißer Feststoff); R<sub>f</sub>-Wert: 0,54 (Essigester/Hexan 4/1). 2,39 g (8,66 mmol) Di-N-(tert.butoxycarbonyl)-ethanolhydrazin und 1,37 g (1,89 ml; 13,6 mmol) Triethylamin wurden in 30 ml Tetrahydrofuran gelöst. Unter Rühren bei Raumtemperatur wurden 3,3 g (14,0 mmol) m-Maleinimidobenzoessäurechlorid, gelöst in 50 ml Tetrahydrofuran, innerhalb von 30 Minuten zutropft. Anschließend wurde der Ansatz 1 h lang gerührt. Es wurde von den ausgefallenen Salzen abfiltriert und die Reaktionslösung im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 2/1; Ausbeute: 35% elfenbeinfarbener Feststoff); R<sub>f</sub>-Wert: 0,65 (Essigester/Hexan 2/1). 2,26 g (4,75 mmol) m-Maleinimidobenzoessäure-2-[di-N-(tert.-butoxycarbonyl)]-hydrazinoethylester wurden in einer 1 M Lösung von HCl in absolutem Ether suspendiert und 15 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wurde der Niederschlag abgesaugt und mit absolutem Ether gewaschen. Der Feststoff wurde im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 50% weißer Feststoff); Schmelzpunkt: Zersetzung > 105°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,28 (Essigester/Hexan 4/1)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 44,70%; H: 4,30%; N: 12,03%;

(C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>) gefunden: C: 45,23%; H: 4,10%; N: 12,13%.

## m-Maleinimidobenzoessäure-2-hydroxyethylamid

In einem Zweihalskolben wurden 10 ml Essigester vorgelegt. 500 mg (2,12 mmol) Maleinimidobenzoessäurechlorid und 128 mg (127 µl, 2,12 mmol) 2-Aminoethanol wurden in je 25 ml Essigester gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur simultan zutropft. Der Ansatz wurde 15 h lang gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum auf die Hälfte eingeeengt und anschließend bei –20°C kaltgestellt. Das sich abscheidende Produkt wurde abgesaugt und aus Essigester/Hexan umkristallisiert (Ausbeute: 65% farbloses Pulver); Schmelzpunkt: 119°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,50 (Essigester/Hexan 3/1).

Elementaranalyse:

berechnet: C: 60,00%; H: 4,62%; N: 10,77%;

(C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) gefunden: C: 60,29%; H: 4,42%; N: 10,78%.

p-Maleinimidophenyllessigsäurehydrazid CF<sub>3</sub>COOH

3,5 g (14 mmol) p-Maleinimidophenyllessigsäurechlorid wurden zusammen mit einem 1,5-fachen Überschuß an



tert.-Butylcarbazat (287 g, 21,7 mmol) in 50 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Tetrahydrofuran wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde in 500 ml Essigester aufgenommen. Die Essigesterphase wurde zweimal mit je 125 ml Wasser ausgeschüttelt und anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft und aus Essigester/Hexan umkristallisiert. Das gelbe Produkt wurde abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 90%); Schmelzpunkt: Zersetzung ab 152°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,50 (Tetrahydrofuran/Hexan 3/1). 2,5 g (7,25 mmol) p-Maleinimidophenyllessigsäurehydrazino-tert.-butylcarbazat wurden in 12 ml eisgekühlter Trifluoressigsäure gelöst und 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach weiterem 20 minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Trifluoressigsäure im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 50 ml Ether gelöst. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit trockenem Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 82% gelbliches Pulver); Schmelzpunkt: 112°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,06 (Tetrahydrofuran/Hexan 3/1)

Elementaranalyse:  
berechnet: C: 46,80%; H: 3,34%; N: 11,70%;  
(C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>) gefunden: C: 46,95%; H: 3,24%; N: 11,51%.

#### m-Maleinimidobenzaldehyd

2,0 g (8,5 mmol) m-Maleinimidobenzoessäurechlorid wurden in 40 ml absoluten Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren und Stickstoffatmosphäre auf -78°C gekühlt (Aceton/Trockeneis). Anschließend wurden innerhalb 1 h 8,4 ml Lithium-tri-tert.-butoxyaluminiumhydrid (1M-Lösung in absoluten Tetrahydrofuran; 8,4 mmol) langsam zugetropft. Nach dem Zutropfen wurde die Suspension langsam auf Raumtemperatur erwärmt und auf 200 ml Eis gegeben. Die gelbliche Lösung wurde eingeeengt, wobei ein Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt und aus Essigester/Hexan umkristallisiert (Ausbeute: 21% gelbes Pulver); Schmelzpunkt: 89°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,55 (Essigester/Hexan 2/1)

Elementaranalyse:  
berechnet: C: 65,68%; H: 3,45%; N: 6,96%;  
(C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>) gefunden: C: 65,24%; H: 3,54%; N: 6,71%.

#### Maleinimidoacetaldehyd

91,6 g (100 ml, 689 mmol) Aminoacetaldehyddiethylacetal wurden in 200 ml Essigester 20 gelöst. Danach wurden 67,54 g (689 mmol) Maleinsäureanhydrid, gelöst in 200 ml Essigester, unter Rühren und Eiskühlung innerhalb 60 Minuten zugetropft. Es wurde 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch auf die Hälfte eingeeengt und bei -20°C kaltgestellt. Nach 24 h wurde der entstandene Niederschlag im Vakuum abgesaugt, mit Essigester und Ether gewaschen, und anschließend im Hochvakuum getrocknet. (Ausbeute: 90%). 30,95 g (133,8 mmol) N-(Acetaldehyddiethylacetal)maleinsäureamid wurden in 900 ml Toluol gelöst, 14,2 g (19,6 ml, 140,5 mmol) Triethylamin hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 15 h lang am Wasserabscheider gekocht. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückbleibende Sirup wurde in 350 ml Diethylether aufgenommen und 3 × mit je 50 ml Wasser extrahiert. Die etherische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Essigester/Hexan 1/1; Ausbeute: 36% farbloser Sirup); R<sub>f</sub>-Wert: 0,49 (Essigester/Hexan 1/1)

Elementaranalyse:  
berechnet: C: 58,15%; H: 7,49%; N: 6,17%;  
(C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>) gefunden: C: 58,10%; H: 6,98%; N: 6,35%.

20,1 g (94,3 mmol) Maleinimidoacetaldehyddiethylacetal wurden in 350 ml Dichlormethan gelöst und 40,2 g Kieselgel 60 unter Rühren hinzugefügt. Es wurden 4,02 g 30%ige Schwefelsäure zugegeben und 60 h lang unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde das Kieselgel abfiltriert und die Reaktionslösung mit 4 × 50 ml Wasser extrahiert. Das Dichlormethan wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der zurückbleibende Sirup wurde aus Essigester/Hexan (1:10) umkristallisiert (Ausbeute: 15% weiße Kristalle); Schmelzpunkt 68–69°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,52 (Tetrahydrofuran/Hexan 3/1)

Elementaranalyse:  
berechnet: C: 51,76%; H: 3,62%; N: 10,06%;  
(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>) gefunden: C: 51,48%; H: 4,14%; N: 9,60%.

#### Chlorameisensäure-2-maleinimidoethylester

2,0 g (14,2 mmol) 2-Hydroxyethylmaleinimid wurden in 150 ml absoluten Dichlormethan gelöst und mit 1,56 g (4,8 mmol) Triphosgen versetzt. Nach Zugabe von 479 mg (660 µl; 4,8 mmol) Triethylamin wurde der Ansatz 72 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 2/1; Ausbeute: 80% farbloser Feststoff); Schmelzpunkt: 45°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,69 (Essigester/Hexan 2/1)

Elementaranalyse:  
berechnet: C: 41,25%; H: 2,95%; N: 6,88%; Cl: 17,41%;  
(C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>4</sub>Cl) gefunden: C: 41,11%; H: 3,00%; N: 6,88%; Cl: 16,94%.

#### Synthese von Bismaleinimidverbindungen

##### 1,4-Diamino-N,N'-di-maleinimidobenzyl-butan

2,36 g (10 mmol) Maleinimidobenzoessäurechlorid sowie 0,44 g (5 mmol) 1,4-Diaminobutan wurden jeweils in 60 ml Ethylacetat gelöst. In einem Dreihalskolben wurden 40 ml Ethylacetat vorgelegt. Unter Rühren bei Raumtemperatur wurden die beiden Lösungen synchron über einen Zeitraum von 30 min zugetropft. Während des Zutropfens fiel ein hellgelber Niederschlag aus. Der Ansatz wurde 2 h lang gerührt, der Niederschlag abgesaugt und mit Diethylether gewaschen. Der hellgelbe Feststoff wurde aus Aceton umkristallisiert, mit Wasser und anschließend nochmals mit Ether gewaschen und i.Vak. getrocknet. Man erhielt 2,1 g (3,9 mmol, 75% d. Theorie) des Produktes als gelb-weißen Feststoff DC:

Kieselgel, THF/Hexan 4 : 1,  $R_f = 0,30$ , Fp.: 221 °C (Zersetzung)

$C_{22}H_{22}N_4O_6$  (486 g/mol)

berechnet: C: 64,20%; H: 4,53%; N: 11,52%; O: 19,75%;

gefunden: C: 62,57%; H: 4,55%; N: 10,67%.

#### 1,4-Dihydrox-O,O'-di-m-maleinimidobenzyl-butan

376 µl (381 mg, 4,1 mmol) 1,4-Butandiol wurden in 80 ml Ethylacetat gelöst und unter Rühren einer Lösung von 2,0 g (8,49 mmol) Maleinimidobenzoessäurechlorid in 80 ml Ethylacetat zugegeben. Anschließend wurden 1200 µl (871 mg, 8,6 mmol) Triethylamin zugetropft und 12 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von weiteren 300 µl (218 mg, 2,2 mmol) Triethylamin wurde erneut 12 h bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung 3 × mit jeweils 70 ml Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Ethylacetat i.Vak. entfernt. Der gelbe Rückstand wurde zweimal aus EE:Hex 2 : 1 umkristallisiert; DC: Kieselgel, THF/Hexan 4 : 1,  $R_f = 0,62$ , Fp.: 135 °C.

$C_{26}H_{20}N_2O_8$  (488 g/mol)

berechnet: C: 63,03%; H: 4,20%; N: 5,88%;

gefunden: C: 63,30%; H: 4,05%; N: 5,52%.

#### Diacylhydrazon aus Adipinsäuredihydrazid und m-Maleinimidoacetophenon

1,0 g (4,65 mmol) m-Maleinimidoacetophenon wurden zusammen mit 368 mg (2,11 mmol) Adipinsäuredihydrazid in 40 ml absolutem Methanol gelöst. Dem Reaktionsansatz wurden 100 µl Trifluoressigsäure hinzugegeben und 15 h bei RT gerührt. Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und 2 × mit je 30 ml MeOH sowie 4 × mit je 50 ml Diethylether gewaschen. Anschließend wurde das Produkt i. Vak. getrocknet; DC: Kieselgel, THF/Hexan 4 : 1,  $R_f = 0,36$ , Fp.: 240 °C (Zersetzung)

$C_{30}H_{28}N_6O_6$  (568 g/mol)

berechnet: C: 63,38%; H: 4,93%; N: 14,79%;

gefunden: C: 63,18%; H: 4,83%; N: 15,03%.

#### Schritt 2: Synthese von Maleinimidderivaten zytostatischer Verbindungen

##### Maleinimidderivate der Alkylantien Chlorambucil und Melphalan

##### O-[4-(4-bis(2-chlorethyl)aminophenyl)]butanoyl-2-hydroxyethylmaleinimid

Chlorambucil (1,0 g; 3,29 mmol) und Hydroxyethylmaleinimid (1,392 g; 13,2 mmol) wurden mit Dimethylaminopyridin (20,1 mg; 0,16 mmol) in 100 ml Dichlormethan gelöst und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (747 mg; 3,62 mmol), gelöst in 100 ml Dichlormethan, binnen 1 h zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 8 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst und über Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Essigester/Hex 1/2). Die Reinfractionen wurden vereinigt und eingedampft, wobei ein schwach gefärbter Sirup zurückblieb. Ausbeute: 576 mg (1,35 mmol; 41% d. Th.) bräunlicher Sirup;  $R_f$ -Wert (Kieselgel): 0,26 (Essigester/Hex 1/2); MS-EI m/z 426 (rel. Intensität) ( $M^+ - 1$ , 12), 377 (100), 286 (7), 181 (10); Elementaranalyse ( $C_{20}H_{24}N_2O_4Cl_2$ , Mr 427,37), berechnet: C 56,2% H 5,6% N 6,6% Cl 16,6%; gefunden: C 57,1% H 6,5% N 5,8% Cl 15,4%.

##### O-[4-(4-bis(2-chlorethyl)aminophenyl)]butanoyl-3-maleinimidophenol

Chlorambucil (1,0 g, 3,3 mmol) und m-Maleinimidophenol (1,87 g, 9,9 mmol) wurden mit Dimethylaminopyridin (18,3 mg, 0,15 mmol) in 50 ml Dichlormethan gelöst. Nun wurde innerhalb von 2 h N-Cyohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (1,57 g; 3,63 mmol), gelöst in 100 ml Dichlormethan, bei Raumtemperatur unter Rühren zugetropft und der Ansatz 6 h lang gerührt. Vom entstandenen Niederschlag wurde abfiltriert und das Reaktionsgemisch im Vakuum eingedampft. Das Produkt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hex 1/1); Ausbeute: 554 mg (1,25 mmol; 38% d. Th.) gelblicher Sirup;  $R_f$ -Wert (Kieselgel): 0,29 (Essigester/Hex 1/1); MS-Cl (rel. Intensität) m/z 475 ( $M^+$ , 100); 457 (38); 377 (54); 304 (13); 190 (93); Elementaranalyse ( $C_{24}H_{24}N_2O_4Cl_2$ , Mr 475,33), berechnet: C 60,6% H 5,1% N 5,9% Cl 15,0%; gefunden: C 59,6% H 5,8% N 5,3% Cl 14,4%.

##### Chlorambucilcarbonsäurehydrazid

Chlorambucil (1,0 g; 3,29 mmol) wurde in 50 ml absoluten  $CH_2Cl_2$  gelöst und mit einem 1,5-fachen Überschuß

an Oxalylchlorid (431  $\mu$ l; 4,8 mmol) versetzt. Es wurde unter Feuchtigkeitsausschluß 15 h lang bei 30–40°C gerührt. Anschließend wurde die Lösung eingedampft und die Reste von Oxalylchlorid im Hochvakuum entfernt.

Das synthetisierte Oxalylcarbonsäurechlorid wurde unmittelbar weiter umgesetzt, indem der entstandene braune Sirup in 20 ml absoluten  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst wurde und dann unter Rühren bei Raumtemperatur t-Butylcarbazat (457 mg; 3,45 mmol), gelöst in 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , langsam zugetropft wurde. Der Ansatz wurde 36 h lang gerührt, vom Unlöslichen abfiltriert und die Lösung im Vakuum auf etwa 3 ml eingengt. Das entstandene Chlorambucil-t-butylcarbazat wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 2/1;  $R_f$ -Wert: 0,52);

Ausbeute: 700 mg (1,67 mmol; 51% d. Th.) brauner Sirup Chlorambucil-t-butylcarbazat (700 mg; 1,67 mmol) wurde in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde 1 h lang unter diesen Bedingungen gerührt; dann wurden das Lösungsmittel und die Trifluoressigsäure im Hochvakuum entfernt.

Acylhydrazonderivat von [4-(4-bis(2-chlorethyl)aminophenyl)]buttersäurehydrazid (Trifluor-acetat-Salz) und 2-Maleinimidoacetaldehyd

Chlorambucilcarbonsäurehydrazid (Trifluoracetat-Salz; 721 mg; 1,67 mmol) wurde in 30 ml Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur mit Maleinimidoacetaldehyd (556 mg; 4,01 mmol) versetzt. Nach 20 Minuten wurde die Reaktionslösung wurde eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Essigester aufgenommen und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (LOBAR®-Diolsäule, Fa. Merck; Laufmittel: Essigester/Hexan 3/2); Ausbeute: 290 mg (0,66 mmol; 40% d. Th.) schwach gelber Sirup; MS-FAB (rel. Intensität)  $m/z$  439 ( $M^+$ , 15), 286 (24), 136 (87); Elementaranalyse ( $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}_2$ , Mr 439,12), berechnet: C 54,7% H 5,5% N 12,8% Cl 16,2%; gefunden: C 54,3% H 5,6% N 11,6%, Cl 15,8%.

Acylhydrazonderivat von [4-(4-bis(2-chlorethyl)aminophenyl)]buttersäurehydrazid (Trifluor-acetat-Salz) und m-Maleinimidoacetophenon

Chlorambucilcarbonsäurehydrazid (Trifluoracetat-Salz; 721 mg; 1,67 mmol) wurde in 30 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur mit 3-Maleinimidoacetophenon (1078 mg; 5,01 mmol) versetzt. Nach 3 h wurde die Reaktion beendet (DC-Kontrolle;  $R_f$ -Wert = 0,30 (Essigester/Hexan 2/1)) und die Lösung eingedampft. Der sirupöse Rückstand wurde in 15 ml Essigester aufgenommen. Nach kurzer Zeit begann sich das Produkt als gelber Niederschlag abzuscheiden. Der Niederschlag wurde abgesaugt und aus Essigester umkristallisiert; Ausbeute: 80 mg (0,16 mmol; 10% d. Th.) gelbes Pulver; Schmelzpunkt: 164°C; MS-FAB (rel. Intensität)  $m/z$  515 ( $M^+$ , 4), 451 (37), 216 (42); Elementaranalyse ( $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}_2$ , Mr 515,22), berechnet: C 60,6%, H 5,4% N 10,9% Cl 13,8%; gefunden: C 60,3% H 5,6%, N 10,4%, Cl 13,7%.

Die Synthese von den entsprechenden Maleinimidderivaten von Melphalan L-[4-(4-bis(2-chlorethyl)aminophenyl)alanin] erfolgte analog zu den oben genannten Vorschriften für Chlorambucil.

Maleinimidderivate von 5-Fluorouracil und 5'-Deoxy-S-fluorouridin

$N_1$ -(m-Maleinimidobenzoyl)-5-fluorouracil

500 mg (3,85 mmol) 5-Fluorouracil wurden in 150 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und mit 389 mg (536  $\mu$ l; 4,62 mmol) Triethylamin versetzt. Nun wurden unter Rühren bei Raumtemperatur innerhalb von 30 Minuten 1088 mg (4,62 mmol) m-Maleinimidobenzoesäurechlorid, gelöst in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran, zugetropft und der Ansatz 5 h lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit 3-mal 150 ml Ether ausgekocht. Die vereinigten Etherphasen wurden eingedampft und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (LOBAR®-(Merck AG)-Diolsäule; Laufmittel: Essigester/Hexan 3/2; Ausbeute: 55% gelbliches Pulver); Schmelzpunkt: 203°C;  $R_f$ -Wert: 0,57 (reverse phase; Acetonitril/Wasser 1/1)

Elementaranalyse: berechnet: C: 54,72%; H: 2,45%; N: 12,76%; ( $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_5\text{F}$ ) gefunden: C: 54,06%; H: 3,03%; N: 12,06%.

$N_1$ -(2-Maleinimidoethyloxycarbonyl)-5-fluorouracil

500 mg (3,84 mmol) 5-Fluorouracil wurden in 100 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 505 mg (696  $\mu$ l, 4,99 mmol) Triethylamin versetzt. Zu dieser Lösung wurden 1016 mg (4,99 mmol) Chlorameisensäure-2-maleinimidoethylester, gelöst in 100 ml Tetrahydrofuran, zugetropft und der Ansatz 15 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (LOBAR®-Diolsäule; Laufmittel: Essigester/Hexan 1,5/1; Ausbeute: 61%); Schmelzpunkt: 132°C;  $R_f$ -Wert: 0,64 (Diol; Essigester/Hexan 2/1).

Elementaranalyse: berechnet: C: 44,29%; H: 2,68%; N: 14,09%; ( $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_6\text{F}$ ) gefunden: C: 44,29%; H: 2,68%, N: 13,58%.

$N_1$ -(m-Maleinimidobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil

1500 mg (11,55 mmol) 5-Fluorouracil und 2,25 ml (25,4 mmol) 37%ige Formaldehydlösung wurden 2 h lang

unter Rühren auf 60°C erwärmt. Anschließend wurde das Wasser im Hochvakuum entfernt und der Rückstand unter Zugabe von 20 mg Dimethylaminopyridin als Katalysator in 80 ml Tetrahydrofuran gelöst. Zu dieser Lösung wurden 3,01 g (13,85 mmol) m-Maleinimidobenzoesäure und 2,858 g (13,85) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 50 ml Tetrahydrofuran, zugegeben und anschließend 15 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in etwa 20 ml Essigester aufgenommen und vom Ungelösten abfiltriert. Die Lösung wurde erneut eingedampft und der Rückstand zur Reinigung zweimal chromatographiert (1. Kieselgel (Essigester/Hexan 2/1); 2. LOBAR®-Diolsäule (Laufmittel: Essigester/Hexan 2/1);

Ausbeute: 5% weißes Pulver); Schmelzpunkt: Zersetzung > 250°C; R<sub>f</sub>-Wert: 0,32 (Essigester/Hexan 2/1)

Elementaranalyse:

berechnet: C: 55,98%; H: 2,92%; N: 12,24%;

(C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>F) gefunden: C: 55,51%; H: 2,87%; N: 11,72%.

5'-Deoxy-5-fluoro-2'-O-(m-maleinimidobenzoyl)-1-β-D-ribo-hexofuranosyluracil (A) und  
5'-Deoxy-5-fluoro-3'-O-(m-maleinimidobenzoyl)-1-β-D-ribo-hexofuranosyluracil (B)

5'-Desoxy-5-fluorouridin (300 mg; 1,22 mmol) wurden in 60 ml absoluten Tetrahydrofuran gelöst und mit 3-Maleinimidobenzoesäurechlorid (402 mg; 1,71 mmol) sowie Triethylamin (333 µl) versetzt und während 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene Triethylammoniumsalz wurde abfiltriert und die Lösung im Wasserstrahlvakuum (40°C) eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Tetrahydrofuran aufgenommen und die beiden Isomere säulenchromatographisch getrennt (Laufmittel: Essigester/Hexan 70/30; LOBAR®-Diolsäule.

(A) Ausbeute: 152 mg, Schmelzpunkt: 86°C; R<sub>f</sub>-Wert (Diol): 0,12 (Essigester/Hexan 2 : 1), (B) Ausbeute 190 mg; Schmelzpunkt: 83°C; R<sub>f</sub>-Wert (Diol): 0,17 (Essigester/Hexan 2 : 1) (A). <sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO): δ (ppm) 1.36 (d, J = 6,0 Hz, 3H, 5, H), 3.98 (dq, J<sub>4,5</sub> = 6.3 Hz, 1H, 4'-H), 4.13 (m, J<sub>3,4</sub> = 6.0 Hz, 1H, 3'-H), 5.51 (t, J<sub>2,3</sub> = 6.2 Hz, 1H, 2'-H), 5.57 (d, J = 6.0 Hz, 1H, 3'-OH), 5.96 (dd, J<sub>1,2</sub> = 4.2 Hz, J<sub>1,3</sub> = 1.2 Hz, 1H, 1'-H), 7.20 (s, 2H, HC=CH), 7.69–8.07 (m, 4H, phenyl), 8.05 (d, J = 10.2 Hz, 1H, 6-H), 11.91 (d, 1H, 3-H); <sup>13</sup>C-NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO): δ (ppm) = 17.82 (C-5'), 72.71 (C-4'), 75.64 (C-3'), 79.25 (C-2'), 87.84 (C-1'), 125.79 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 36 Hz, C-6), 127.66, 128.70, 129.35, 130.15, 132.01, 131.77 (phenyl), 134.76 (HC CH), 140.13 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 242 Hz, C-5), 148.05 (C-2), 157.03 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 28 Hz, C-4), 164.12 (ester), 169.68 (C-O), FAB-MS (4-Nitrobenzylalkohol, 3 kV): M/z (%): 446 [M<sup>+</sup> + 1] (8); Elementaranalyse (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>F (445.3)): C 53,9% H 3,6 N 9,4%; gefunden: C 54,7% H 4,4% N 8,98%. (B) FAB-MS (4-Nitrobenzylalkohol, 3 kV): m/z (%): 446 [M<sup>+</sup> + 1] (6); Elementaranalyse (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>F (445.3)): C 53,9% H 3,6% N 9,4%; gefunden: C 52,5% H 3,8% N 8,7%.

2'-O-3'-O-Acetale (A) bzw. Ketale (B) von 5'-Deoxy-5-fluorouridin

1,5 mmol 5'-Desoxy-5-fluorouridin wurden in 60 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 8 mmol Maleinimidoacetaldehyd (bzw. m-Maleinimidoacetophenon) und 5 mg p-Toluolsulfonsäure versetzt und während 12–24 h bei T = 60 °C gerührt. Die Lösung wurde anschließend im Wasserstrahlvakuum (40°C) eingedampft, der Rückstand in wenig Essigester gelöst und das Acetal bzw. Ketal säulenchromatographisch getrennt (Laufmittel: Essigester/Hexan 50/50; LOBAR®-Diolsäule (Merck).

(A) Ausbeute: 162 mg, Schmelzpunkt: 71°C; R<sub>f</sub>-Wert (Diol): 0,19 (Essigester/Hexan 1 : 1), (B) Ausbeute 110 mg, Schmelzpunkt: 88°C; R<sub>f</sub>-Wert (Diol): 0,21 (Essigester/Hexan 1 : 1).

Maleinimidderivate der Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin und Idarubicin

Die Synthesen der Maleinimidderivate der Anthrazykline sind stellvertretend für Doxorubicin aufgeführt, die der Anthrazykline Daunorubicin, Epirubicin und Idarubicin erfolgt analog.

3'-Aminoamidderivat von Doxorubicin mit p-Maleinimidophenylelessigsäurechlorid

500 mg (0,86 mmol) Doxorubicin Hydrochlorid wurden in 50 ml absolutem DMF gelöst und 1013 mg (4,30 mmol) p-Maleinimidophenylelessigsäurechlorid und 719 µl (522 mg; 5,16 mmol) Triethylamin zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 15 h lang gerührt. DMF wurde unter Hochvakuum entfernt, und der Rückstand in etwa 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, gefiltert und über eine Kieselgelsäule (Tetrahydrofuran/Hexan 3/1) gereinigt: 189 mg des roten Produktes (29%); R<sub>f</sub>-Wert: 0,26 (Ethylacetat/Hexan 3/1); Schmelzpunkt: 110°C; <sup>13</sup>C-NMR-Daten (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8 16.79 (C-6), 29.31 (C-2), 38.67 (C-10), 38.95 (C-8), 46.63 (C-3'), 56.17 (C-7''), 56.40 (–OCH<sub>3</sub>), 66.16 (C 14), 66.20 (C-4'), 71.85 (C-5'), 72.72 (C-7); 77.18 (C-9), 99.20 (C-1'), 110.33 (C-5a); 110.67 (C-11a), 118.97 (C-4a), 119.90 (C-3), 120.13 (C-1); 126.59; 129.43; 129.63; 129.95 (C-3'' bis C-6''); 134.60 (C-1''a/1''b); 135.03 (C-12a), 135.48 (C-10a), 136.04 (C-6a), 136.20 (C-2), 153.57 (C-11), 153.65 (C-6), 160.60 (C-4); 169.75 (C-2''a/2''b); 171.73 (amid-C); 186.35 (C-12); 186.45 (C-5); 213.68 (C-13) Elementaranalyse berechnet für C<sub>39</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>: C 61,84% H 4,75% N 3,70%. gefunden: C 61,35% H 5,14% N 3,45%.

C-13-Benzoylhydrazonderivat von Doxorubicin und m-Maleinimidobenzoesäurehydrazid

0,2 mmol Doxorubicin Hydrochlorid und 1,0 mmol m-Maleinimidobenzoesäurehydrazid (Trifluoroacetat-Salz) wurden in 100 ml absoluten Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurden 100 µl CF<sub>3</sub>COOH zugegeben, und die Reaktionsmischung 96 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend auf etwa 50 ml

eingeeengt. Acetonitril wurde bis zur Trübung zugegeben und die Suspension bei  $-20^{\circ}\text{C}$  24 h lang kaltgestellt. Das rote Produkt wurde durch Zentrifugieren gesammelt und aus Methanol/Acetonitril unkristallisiert: 376 mg (55%),  $R_f$ -Wert (reverse phase, Acetonitril/0.005 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 5.0) = 70/30): 0.33, Schmelzpunkt:  $> 185^{\circ}\text{C}$  (Zersetzung),  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 8 : 16.71 (C-6'); 28.22 (C-2'); 33.17 (C-10); 38.71 (C-8); 46.64 (C-3'); 56.59 (— $\text{OCH}_3$ ); 66.11 (C-14); 66.18 (C-4'); 71.26 (C-5'); 71.81 (C-7); 71.98 (C-9); 99.27 (C-1'); 110.03 (C-5a); 110.54 (C-11a); 118.69 (C-4a); 118.96 (C-3); 121.30 (C-1); 124.18; 126.73; 130.95; 131.47; 131.91; 132.34 (C-3'' bis C-8''); 134.15 (C-12a); 134.72 (C-1''a/1''b); 134.76 (C-10a); 135.21 (C-6a); 136.19 (C-2); 153.65 (C-11); 154.72 (C-6); 156.27 (C-13); 160.77 (C-4); 169.63 (C-2''a/2''b); 184.39 (acyl-C); 184.40 (C-12); 186.48 (C-5); MS-FAB (rel Intensität; 4-Nitrobenzylalkohol):

Berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Cl}$ ,  $M_r = 793.81$  g/mol;  $m/z = [M^+ - \text{HCl}] 758$  (2.58%);  
Elementaranalyse berechnet für  $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Cl}$ : C 57,50% H 4,82% N 7,06% Cl 4,46%;  
gefunden: C 57,84% H 5,24% N 7,35% Cl 4,12%.

### 3'-Iminderivat von Doxorubicin mit Maleinimidoacetaldehyd

201 mg Doxorubicin-Hydrochlorid (0,345 mmol) wurden zusammen mit 500 mg Maleinimidoacetaldehyd (3,59 mmol) in 50 ml wasserfreiem DMF gelöst und für 48 Stunden bei  $60^{\circ}\text{C}$  gerührt. Danach wurde das DMF im Hochvakuum entfernt. Der rote Rückstand wurde daraufhin dreimal mit jeweils ca. 200 ml Essigester aufgenommen, filtriert und auf 5 ml eingeeengt. Danach erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung mittels präparativen Diolsäule (Lobar® von Merck) mit Essigester/Hexan 70/30 als Laufmittel. Ausbeute: 29,8 mg (0,0448 mmol), Dünnschichtchromatographie:  $R_f = 0,4$  auf Kieselgel mit THF/Hexan 3/1 als Laufmittel. Elementaranalyse berechnet für  $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{13}$ : C 59,64% H 4,82% N 4,22%; gefunden: C 60,10% H 4,78% N 4,11%.

### Maleinimidderivate von Cisplatin Analoga

Das Verfahren für die Herstellung der Maleinimidderivaten mit ciskonfigurierten Platin(II)-Einheiten wird durch folgendes Beispiel erläutert. N-(O-(3-Maleinimidobenzoyl)-2-hydroxyethyl)-1,2-diaminoethandichloroplatin(II) — vierstufige Synthese.

#### N-(2-Hydroxyethyl)-N,N'-bis-tertiärbutyloxycarbonyl-1,2-diaminoethan

Zu einer Lösung von 20,8 g (200 mmol) N-(2-Hydroxyethyl)-1,2-Diaminoethan in 100 ml Dichlormethan werden 47,96 g (2,20 mmol, 0,5 eq) bis-Tertiärbutyloxycarbonylanhydrid, gelöst in 200 ml Dichlormethan langsam bei Raumtemperatur zugetropft. Der Ansatz wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit 100 ml Diethylether verdünnt und mit 150 ml Wasser extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird i. Vak. eingeeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Säulenchromatographie (Ethylacetat/Hexan (1 : 1,5),  $R_f$ -Wert (Ethylacetat/Hexan 1 : 1,5):  $R_f = 0,18$ ; Ausbeute:

30 g (98,68 mmol). Elementaranalyse für  $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$  (304 g/mol)

berechnet: C: 55,26%; H: 9,21%; N: 9,21%;

gefunden: C: 55,50%; H: 9,18%; N: 9,02.

#### N-(O-(3-Maleinimidobenzoyl)-2-hydroxyethyl)-N,N'-bis-tertiärbutyloxycarbonyl-1,2-diaminoethan

Zu einer Lösung von 8 g (26,3 mmol) N-(2-Hydroxyethyl)-N,N'-bis-tertiärbutyloxycarbonyl-1,2-diaminoethan in 50 ml Tetrahydrofuran und 4 ml (28,9 mmol, 1,1 eq) Triethylamin werden 6,82 g (29 mmol, 1,1 eq) Maleinimidobenzoesäurechlorid, gelöst in 100 ml Tetrahydrofuran, bei Raumtemperatur unter Rühren innerhalb 1 h zuge-  
tropft. Nach weiteren 8 h Rühren bei Raumtemperatur ist laut DC vollständiger Umsatz erreicht. Das bei der Reaktion gebildete Triethylammoniumchlorid wird abfiltriert. Nach Entfernen von Tetrahydrofuran und überschüssigem Triethylamin i. Vak. wird das anfallende, gelbe Öl säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel: Ethylacetat/Hexan (1 : 1),  $R_f$ -Wert (Ethylacetat/Hexan 1 : 1) = 0,2, Ausbeute: 9,6 g (19,1 mmol) des Produkts in Form eines gelben Öls, entsprechend 72,6% der theoretisch möglichen Ausbeute. Elementaranalyse für  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_8$  (503 g/mol)

berechnet: C: 59,64%; H: 6,56%; N: 8,35%;

gefunden: C: 60,04%; H: 6,77%; N: 8,24%.

#### N-(O-(3-Maleinimidobenzoyl)-2-hydroxyethyl)-1,2-diaminoethan Dihydrochlorid

6 g (11,93 mmol) N-(O-(3-Maleinimidobenzoyl)-2-hydroxyethyl)-N,N'-bis-tertiärbutyloxycarbonyl-1,2-diaminoethan werden in einem gasdichten Kolben mit 60 ml (5 eq) einer 1M Lösung von HCl in Diethylether unter Rühren bei Raumtemperatur versetzt. Nach 48 h Rühren bei Raumtemperatur wird der feinkristalline Niederschlag über eine G4-Glasfritte abgesaugt, durch mehrmaliges Waschen mit wasserfreiem Ether von HCl-Resten befreit und i. Vak. getrocknet. Man erhält 3,0 g (7,98 mmol) des Produkts als feinpudrigen, gelben Feststoff, entsprechend 66,9% der theoretisch möglichen Ausbeute. Elementaranalyse für  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{Cl}_2$  (375,9 g/mol)

berechnet: C: 47,89%; H: 5,05%; N: 11,17%; Cl: 18,86%;

gefunden: C: 46,97%; H: 5,42%; N: 10,03%; Cl: 17,63%.

## N-(O-(3-Maleinimidobenzoyl)-2-hydroxyethyl)-1,2-diaminoethandichloroplatin(II)

104 mg (0,25 mmol)  $K_2PtCl_4$  und 94,2 mg (0,25 mmol) N-(O-(3-Maleinimidobenzo)-2-hydroxyethyl)-1,2-diaminoethan Dihydrochlorid werden in jeweils 5 ml 20% Tetrahydrofuran/Wasser gelöst und portionsweise  
 5 vermischt. Die zunächst rote  $K_2PtCl_4$ -Lösung wird zunehmend entfärbt, es bildet sich ein hellgelber Niederschlag. Etwa 1 h nach der letzten Zugabe kann das Präzipitat durch eine G4-Glasfritte abgesaugt werden. Es wird sukzessive mit kleinen Portionen Wasser, 20% Tetrahydrofuran/Wasser und zuletzt mit Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen i.Vak. erhält man 106 mg (0,18 mmol) des Produktes in Form eines feinpudrigen, gelben Pulvers, entsprechend 72% der theoretisch möglichen Ausbeute. Elementaranalyse für  $C_{15}H_{17}N_3O_4PtCl_2$  (569 g/mol)

berechnet: C: 31,63%; H: 2,99%; N: 7,38%; Pt: 34,29%; Cl: 12,46%;  
 gefunden: C: 31,19%; H: 3,37%; N: 6,79%; Pt: 32,35%; Cl: 12,95%.

## Schritt 3: Thiolierung des Trägerproteins

Das Verfahren für die Thiolierung wird durch folgendes Beispiel genauer dargestellt.

32 mg humanes Serumtransferrin (98% kristallin, Mr 80 000) [bzw. 28,4 mg humanes Serumalbumin (98% kristallin, Mr 66 500)] werden in 1 ml mit Argon entgastem 0,1 M Natriumborat, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl — pH = 8,0 gelöst ( $c[\text{Transferrin/Albumin}] = 4,0 \times 10^{-4}$  M) gelöst und mit 100  $\mu$ l einer frisch hergestellten  $4 \times 10^{-2}$  M Iminothiolanlösung (5,5 mg Iminothiolan gelöst in 1 ml entgastem 0,1 M Natriumborat, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA — pH = 8,0) versetzt (10-facher Überschuß an Iminothiolan). Nach 60–70 min wird das überschüssige Iminothiolan durch Gelfiltration (Säule 1,0 cm  $\times$  10 cm, Sephadex G.25) mit dem Laufpuffer 0,05 M Natriumborat, 0,15 M NaCl — pH 7,5 vom thiolierten Transferrin bzw. Albumin getrennt. Die Proteinkonzentration nach erfolgter Gelfiltration wurde bei 280 nm  $\epsilon_{280} = 92\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ,  $c[\text{Transferrin}] = 2,4 \times 10^{-4}$  M) bzw.  $\epsilon_{280} = 35\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , ( $c[\text{Albumin}] = 2,2 \times 10^{-4}$  M) und die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen mit Ellmanns Reagenz bei 412 nm  $\epsilon_{412} = 13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  ( $c[\text{HS-Gruppen}] = 7,4 \times 10^{-4}$  M bzw.  $7,7 \times 10^{-4}$  M). Das Verhältnis  $c[\text{HS-Gruppen}]/c[\text{Transferrin}]$  betrug demnach 3,1 und das Verhältnis  $c[\text{HS-Gruppen}]/c[\text{Albumin}]$  betrug 3,5.

Die folgenden Tabellen fassen die Reaktionsbedingungen zusammen, durch die eine unterschiedliche Anzahl von HS-Gruppen in Transferrin bzw. Albumin eingeführt werden.

Tabelle 1a

Reaktionsbedingungen für die Einführung von HS-Gruppen in Transferrin

$c[\text{Iminothiolan}]/c[\text{Protein}]$	Reaktionszeit, min	Temperatur, °C	Anzahl eingeführter HS-Gruppen/Protein
10 : 1	60 - 75	0 - 5	1
10 : 1	60 - 75	20 - 25	2-3
20 : 1	60 - 75	20 - 25	5-6
30 : 1	60 - 75	20 - 25	9-10
40 : 1	60 - 75	20 - 25	12-13
50 : 1	60 - 90	20 - 25	15-16
70 : 1	60 - 90	20 - 25	20-21

Tabelle 1b

Reaktionsbedingungen für die Einführung von HS-Gruppen in Albumin

c[Iminothiolan]/ c[Protein]	Reaktionszeit, min	Temperatur, °C	Anzahl eingeführter HS-Gruppen/Protein
10 : 1	60 - 75	0 - 5	1
10 : 1	60 - 75	20 - 25	2-3
20 : 1	60 - 75	20 - 25	5-6
30 : 1	60 - 75	20 - 25	9-10
50 : 1	60 - 95	20 - 25	15-16
100 : 1	60 - 90	20 - 25	30-32

Die so thiolierte Proteinprobe wurde direkt für die folgende Reaktion im Schritt 4 verwendet.

#### Schritt 4: Kopplung des Maleinimiderivats (Schritt 2) an das thiolierte Trägerprotein (Schritt 3)

Methoden-FPLC für die Herstellung der Konjugate: P-500 pump, LCC 501 Controller (Pharmacia) und LKB 2151 UV-Monitor, Puffer: Standardborat: 0,025 M Natriumborat, 0,15 M NaCl — pH 7,5. Die Proteinkonzentration des Konjugats wurde mit dem BCA-Proteinassay von Pierce (USA) bestimmt.

#### Transferrinkonjugat mit dem 3'-Aminoamidderivat von Doxorubicin und p-Maleinimidophenyllessigsäure (Amid<sub>1</sub>)

3,5 ml thiolierte Transferrinprobe (3,3 eingeführte HS-Gruppen) wurden auf 30 ml mit Standardborat verdünnt und 1,0 ml einer Lösung von Amid<sub>1</sub> (Mr 742,68) in DMF (1,8 mg gelöst in 1,0 ml DMF) zugegeben und vermischt. Nach 10 min wurde die Lösung auf ungefähr 2,0 ml mit CENTRIPREP®-10-Konzentratoren von Amicon, FRG (60 min bei 4°C und 4500 U/min) eingengt. Die konzentrierte Probe wurde (5 min) mit einer Sigma 112 Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand auf eine Sephadex G-25F Säule (Säule 1,0 cm × 10 cm) gegeben und das Konjugat isoliert (Retentionsvolumen: 3,5–7,0 ml). Die Menge an gebundenem Doxorubicin wurde mit Hilfe der Epsilonwerte für Doxorubicin  $\epsilon_{495} = 10\,650\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  bestimmt von dem der entsprechende Beitrag von Transferrin bei dieser Wellenlänge abgezogen wurde  $\epsilon[\text{Tf}]_{495} = 4100\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Die Konzentration des gebundenen Doxorubicins betrug 322  $\mu\text{M}$  und die von Transferrin 101  $\mu\text{M}$ .

#### Albuminkonjugat von O-[4-(4-bis(2-chloroethyl)aminophenyl)]butanoyl-3-maleinimido-phenol

2,2 ml thiolierte Albuminprobe (2,1 eingeführte HS-Gruppen) wurden mit 0,1 ml einer Lösung von O-[4-(4-bis(2-chloroethyl)aminophenyl)]butanoyl-3-maleinimidophenol in DMF (0,9 mg gelöst in 0,1 ml DMF) vermischt, nach 10 min zentrifugiert und der Überstand auf eine Sephadex G-25F Säule (Säule 1,0 cm × 10 cm) gegeben und das Konjugat isoliert (Retentionsvolumen: 3,7–7,1 ml). Die Menge an gebundenem Chlorambucil wurde mit Hilfe des Tests nach Epstein (Epstein et al., Anal. Chem. 1955, 27, 1435–1439) bestimmt. Sie betrug bei diesem Arbeitsvorgang 280  $\mu\text{M}$ .

#### Transferrinkonjugat von N-(O-(3-Maleinimidobenzoyl)-2-hydroxyethyl)-1,2-diaminoethan-dichloroplatin (II)

4,2 ml thiolierte Transferrinprobe (4,6 eingeführte HS-Gruppen) wurden auf 30 ml mit Standardborat verdünnt und 1,0 ml einer Lösung von N-(O-(3-Maleinimidobenzoyl)-2-hydroxyethyl)-1,2-diaminoethandichloroplatin(II) in DMF (1,6 mg gelöst in 1,0 ml DMF) wurden zugegeben und vermischt. Nach 20 min wurde die Lösung auf ungefähr 2,0 ml mit CENTRIPREP®-10-Konzentratoren von Amicon, FRG (60 min bei 4°C und 4500 U/min) eingengt. Die konzentrierte Probe wurde (5 min) mit einer Sigma 112 Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand auf eine Sephadex G-25F Säule (Säule 1,0 cm × 10 cm) gegeben und das Konjugat isoliert (Retentionsvolumen: 3,2–6,8 ml). Die Menge an gebundenem Platinkomplex wurde mit Hilfe des Tests nach Gonias und Pizzo (Gonias, S.L., Pizzo, S.V. J. Biol. Chem. 1982, 258, 5764–5769) bestimmt. Sie betrug bei diesem Arbeitsvorgang 580  $\mu\text{M}$ .

#### Konjugat bestehend aus mit Doxorubicin (Amid<sub>1</sub>) beladenem Albumin und Transferrin

30 mg Humanserumalbumin wurden in 2,0 ml mit Argon entgastem 0,1 M Natriumborat, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl — pH — 8,0 bei Raumtemperatur (RT) gelöst. Zu dieser Mischung wurden 183  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus 2,9 mg Iminothiolan in 250  $\mu\text{l}$  entgastem 0,1 M Natriumborat, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl pH 8,0 zugegeben, gut

durchmischt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Iminothiolan durch Gelfiltration abgetrennt. Die Messung der Proteinkonzentration, sowie der Konzentration an freien SH-Gruppen ergab folgende Werte:  $[Albumin] 1,44 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ ,  $[SH\text{-Gruppen}] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ . Die durchschnittliche Zahl der SH-Gruppen pro Albuminmolekül ergab sich aus dem Quotienten beider Konzentrationen zu 8,7.

2,0 ml dieser thiolierten Albuminlösung wurden für die weitere Umsetzung verwendet. Um 7 der 8,7 SH-Gruppen pro Protein mit 3'-Aminoamidderivat von Doxorubicin und p-Maleinimidophenyllessigsäure (Amid<sub>1</sub>) abzusättigen wurde die Eiweißlösung zunächst mit Standardboratpuffer auf 10 ml verdünnt. Dann wurden unter Schütteln 40 µl einer Lösung von 40 mg Amid<sub>1</sub> in 1 ml DMF zugegeben und 10 Minuten lang bei RT inkubiert. Danach wurde die Probe 5 min lang zentrifugiert (3000 g, 4°C). Der Überstand wurde mit Centricon 3000-Konzentratoren® (Fa. Amicon) auf ein Volumen von etwa 1 ml eingengt (3000 g, 3 × 15 min, 4°C).

Anschließend wurden 25 mg Humanserumtransferrin in 1,2 ml in mit Argon entgastem 0,1 M Natriumborat, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl — pH = 8,0 Standardpuffer gelöst. Zu dieser Mischung wurden 15 µl einer Lösung aus 29 mg Iminothiolan in 250 µl in mit Argon entgastem 0,1 M Natriumborat, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl — pH = 8,0 zugegeben, durchmischt und 1 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Iminothiolan durch Gelfiltration abgetrennt. Die Messung der Proteinkonzentration sowie der Konzentration an freien SH-Gruppen (Test nach Ellmann) ergab folgende Werte:  $[Transferrin] = 1,20 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ ,  $[SH\text{-Gruppen}] = 1,96 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ . Die durchschnittliche Zahl der SH-Gruppen pro Transferrinmolekül ergab sich aus dem Quotienten beider Konzentrationen zu 1,6.

1,9 ml der so thiolierten Transferrinlösung wurden für die weitere Umsetzung zunächst mit Standardboratpuffer auf 10 ml verdünnt. Dann wurden der Reaktionsmischung 72 µl einer Lösung von 10 mg 1,4-Diamino-N,N'-di-m-maleinimidobenzyl-butan in 200 µl DMF zugegeben. Nach 10 min bei RT wurde die trübe Mischung zentrifugiert (5 min, 3000 g, 4°C). Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und in einem Centricon® 3000 Konzentrador auf ein Volumen von 600 µl eingengt. Zur Entfernung überschüssigen Bismaleinimid wurde über Sephadex 25 gefiltriert.

1500 µl einer Lösung mit dem so modifizierten Transferrin wurden zu 500 µl der obigen mit Doxorubicin beladenen Albuminlösung gegeben, gut vermischt und 15 min lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in Microcon 10 Konzentratoren® (Fa. Amicon) auf ein Volumen von 150 µl eingengt. Die konzentrierte Eiweißlösung wurde gelchromatographisch in ihre Bestandteile (Monomere, Dimere, Oligomere) getrennt. Säulendimension: h. 40 cm, Ø. 1 cm, Loop. 100 µl, stationäre Phase. Superdex 200 Pharmacia, mobile Phase. Boratpuffer; pH 6,8; +4°C N<sub>2</sub>-begast, Fluß. 1 ml/min, Detektion. photometrisch, λ 280 nm, Retentionsvolumina. Oligomere. 9,5 ml 11,5 ml, Trimere: 11,7 ml — 12,6 ml, Dimere. 12,7 ml 14,4 ml, Monomere. 14,5 ml — 18,5 ml. Die Ausbeute der gewünschten Dimere bezüglich des eingesetzten Amid<sub>1</sub> betrug 20—30%.

#### In vitro Untersuchungen

Die Wirksamkeit der Konjugate wurde mit einem Zytotoxizitäts-Assay und mit Hilfe des BrdU(5-Brom-2'-deoxyuridin)-Einbaus in der Zellkultur bestimmt (menschliche Zelllinien: Leukämie K562 für Konjugate der Alkylantien, Mammacarcinoma MDA-MB 468 für Konjugate der Anthrazykline, Colonicarcinoma HCT-116 für Konjugate der Antimetabolite und Ovariancarcinoma (SKOV 3) für Konjugate der Platinverbindungen).

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in der Regel in 75 cm<sup>2</sup> großen Gewebekulturschalen bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten, mit 5% CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre. Die Zellen wurden routinemäßig in RPMI 1640 Medium oder in DMEM Medium kultiviert. Den Medien wurde 10% fötales Kälberserum, 4 mM L-Glutamin und jeweils 100 U/ml Penizillin/Streptomycin zugefügt. Adhärenz wachsende Zellen werden zur Subkultur mit Trypsin vom Schalenboden gelöst und nach zweimaligem Waschen mit PBS in frischem Medium aufgenommen.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurden die Zellen in 24-Loch Gewebekulturplatten 24 h lang zur Adhärenz gebracht, die Basiszellzahl (Basis) bestimmt und die verbleibenden Ansätze mit den Konjugaten und zytostatischen Verbindungen konzentrationsabhängig inkubiert. Veränderungen in der Zellteilungsaktivität wurden mit einem Zellzahlgerät (CASY 1) bestimmt.

Zur Bestimmung der DNA-Synthese wurde das BrdU-Markierungs- und Detektionssystem III der Firma Boehringer Mannheim gemäß Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

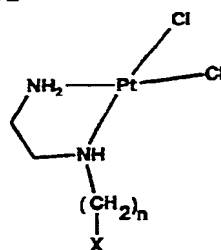
Unter diesen experimentellen Bedingungen zeigten die wie vorstehend aufgeführt synthetisierten Konjugate eine der ungebundenen zytostatischen Verbindung gleichwertige bzw. höhere Wirksamkeit.

#### Patentansprüche

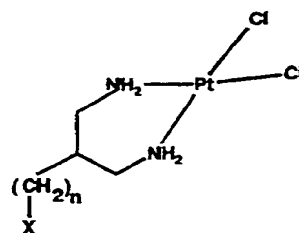
1. Transferrin- und Albuminkonjugate zytostatischer Verbindungen, die Konjugate aus thioliertem Transferrin oder Albumin und mindestens einer derivatisierten zytostatischen Verbindung sind, wobei die derivatisierte zytostatische Verbindung aus den Anthrazyklinen Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin oder Idarubicin, aus den Alkylantien Chlorambucil oder Melphalan, aus den Antimetaboliten 5-Fluorouracil oder 5'-Deoxy-5-fluorouridin oder aus einem derivatisierten Cisplatin-Analogon der allgemeinen Formel I, II oder III:



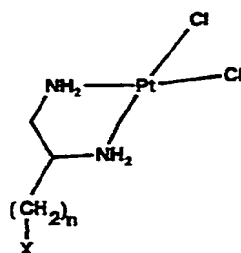
Formel I



Formel II

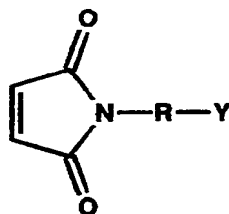


Formel III



$n = 0-6$ ,  $X = -NH_2, -OH, -O-CO-(CH_2)_n-CO-CR^*, -NH-CO-(CH_2)_n-CO-CR^*$   $R^* = H$ , Phenyl, Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffatomen und einer aliphatischen bzw. aromatischen Maleinimidverbindung der allgemeinen Formel IV besteht,

Formel IV:



worin für den Fall, daß R eine aliphatische Kohlenstoffkette mit 1-6 Kohlenstoffatomen bedeutet,  $Y = -OH, -COOH, -COCl, -COO-(CH_2)_n-OH, -COO-(CH_2)_n-NH_2, -COO-(CH_2)_n-NHNH_2, -SO_3H, -SO_3Cl, -SO_2-NHNH_2, -O-COCl, -CHO, -COR^*$  ist mit  $n = 1-6$  und  $R^* = H$ , Phenyl, Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffatomen ist, und worin für den Fall, daß R eine substituierte bzw. unsubstituierte Benzylgruppe oder eine substituierte bzw. unsubstituierte Phenylengruppe bedeutet,  $Y = -OH, -COOH, -COCl, -COO-(CH_2)_n-OH, -COO-(CH_2)_n-NH_2, -COO-(CH_2)_n-NHNH_2, -SO_3H, -SO_3Cl, -SO_2-NHNH_2, -O-COCl, -CHO, -COR^*, -CO-NHNH_2$  mit  $n = 1-6$  und  $R^* = H$ , Phenyl, Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffatomen ist, so daß Maleinimidderivate von zytostatischen Verbindungen bereitgestellt werden, wobei die chemische Verknüpfung zwischen Maleinimidverbindung und zytostatischer Verbindung durch eine Amid-, Ester-, Imin-, Hydrazon-, Acyl- bzw. Benzoylhydrazon-, Oxycarbonyl-, Acetal- oder Ketalbindung erfolgen kann.

2. Transferrin- und Albuminkonjugate gemäß Anspruch 1, die aus thiolisiertem Transferrin- bzw. Albumin und mindestens einer derivatisierten zytostatischen Verbindung bestehen, die bei den Anthrazyklinen Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin oder Idarubicin Maleinimidderivate umfassen, die aus dem jeweiligen Anthrazyklin und den unter Anspruch 1 genannten Säuren von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die 3'-NH<sub>2</sub>-Gruppe des Aminozuckers des Anthrazyklins als Amidbindung erfolgt, die aus dem jeweiligen Anthrazyklin und den unter Anspruch 1 genannten Aldehyden bzw. Ketonen von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die 3'-NH<sub>2</sub>-Gruppe des Aminozuckers des Anthrazyklins als Iminbindung erfolgt, oder die aus dem jeweiligen Anthrazyklin und den unter Anspruch 1 genannten Aminen von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die C<sub>13</sub>-Ketoposition des Anthrazyklins als Iminbindung erfolgt, oder die aus dem jeweiligen Anthrazyklin und den unter Anspruch 1 genannten Säurehydraziden von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die C<sub>13</sub>-Ketoposition des Anthrazyklins als Acyl- bzw. Benzoylhydrazonbindung erfolgt.

3. Transferrin- und Albuminkonjugate gemäß Anspruch 1, die aus thiolisiertem Transferrin- bzw. Albumin und mindestens einer derivatisierten zytostatischen Verbindung bestehen, die bei den Alkylantien Chlorambucil und Melphalan Maleinimidderivate umfassen, die aus dem jeweiligen Alkylantien und den unter Anspruch 1 genannten Hydroxymaleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die COOH-Gruppe von Chlorambucil bzw. Melphalan als Esterbindung erfolgt, oder die aus dem Säurehydrazid des

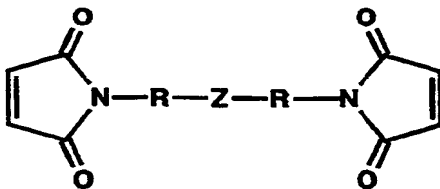
jeweiligen Alkylans und den unter Anspruch 1 genannten Aldehyden oder Ketonen von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die COOH-Gruppe von Chlorambucil bzw. Melphalan als Acyl- bzw. Benzoylhydrazonbindung erfolgt.

4. Transferrin und Albuminkonjugate gemäß Anspruch 1, die aus thiohertem Transferrin bzw. Albumin und mindestens einer derivatisierten zytostatischen Verbindung bestehen, die bei 5-Fluorouracil Maleinimidderrivate umfassen, die aus 5-Fluorouracil und den unter Anspruch 1 genannten Säuren bzw. Oxycarbonyen von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die 1'- oder 3'-NH-Gruppe von 5-Fluorouracil als Amid bzw. als Oxycarbonylbindung erfolgt, oder die aus 1- oder 3-(Hydroxymethyl)-5-fluorouracil und den unter Anspruch 1 genannten Säuren von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die 1'- oder 3'-NH-Gruppe als Carbonyloxymethylbindung erfolgt, die bei 5'-Deoxy-5-fluorouridin Maleinimidderrivate umfassen, die aus 5'-Deoxy-5-fluorouridin und den unter Anspruch 1 genannten Säuren von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die 2'-HO- oder 3'-HO-Gruppe von 5'-Deoxy-5-fluorouridin als Esterbindung erfolgt, oder die aus 5'-Deoxy-5-fluorouridin und den unter Anspruch 1 genannten Aldehyden bzw. Ketonen von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die 2'-HO- und 3'-HO-Gruppe von 5'-Deoxy-5-fluorouridin als Acetal- bzw. Ketalbindung erfolgt.

5. Transferrin- und Albuminkonjugate gemäß Anspruch 1, die aus thioliertem Transferrin- bzw. Albumin und mindestens einer derivatisierten zytostatischen Verbindung bestehen, die bei den derivatisierten Cisplatin-Analoga der allgemeinen Formel I, II und III Maleinimidderrivate umfassen, die aus dem jeweiligen Cisplatin-Analogon und den unter Anspruch 1 genannten Säuren von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die endständige HO-Gruppe des jeweiligen Cisplatin-Analogons als Esterbindung oder über die endständige H<sub>2</sub>N-Gruppe des jeweiligen Cisplatin-Analogons als Amidbindung erfolgt, oder die aus dem jeweiligen Cisplatin-Analogon und den unter Anspruch 1 genannten Säurehydraziden, Hydrazinen bzw. Aminen von Maleinimidverbindungen bestehen, wobei die Kopplung über die endständige Aldehyd- bzw. Keto-Gruppe von  $-O-CO-(CH_2)_n-COR^*$ ,  $-NH-CO-(CH_2)_n-COR^*$  des jeweiligen Cisplatin-Analogons als Acyl- bzw. Benzoylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminbindung erfolgt.

6. Bismaleinimidverbindungen der allgemeinen Formel V, die aus den in Anspruch 1 genannten Maleinimidverbindungen bestehen, wobei zwei Maleinimidverbindungen durch eine Gruppe Z verbunden sind, die eine Diaminoalkan-, Dihydroxyalkan-, Dihydrazinoalkan- oder Carbonsäuredihydrazid-Verbindung darstellt, so daß zwei Maleinimidverbindungen über zwei Amid-, Ester-, Imin-, Hydrazon oder Acylhydrazonbindungen miteinander verbunden sind.

#### Formel V:



Z =  $-CO-NH-(CH_2)_n-NH-CO-$ ,  $CO-O-(CH_2)_nO-CO-$ ,  $-C=NH(CH_2)_n-NH=C-$ ,  $-C=N-NH-(CH_2)_nNH-N=C-$ ,  $-C=N-NH-CO-(CH_2)_n-CO-NH-N=C-$ ,  $n = 2-12$ .

7. Chemoimmunokonjugat bestehend aus Albumin, das gemäß Anspruch 1 bis 5 mit zwischen etwa fünf und dreißig Äquivalenten einer zytostatischen Verbindung beladen ist und das weiterhin mit einem Protein, beispielsweise mit Transferrin oder mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen ein tumorassoziiertes Antigen gerichtet ist, vorzugsweise aber mit Transferrin, über eine der in Anspruch 6 genannten Bismaleinimidverbindung oder einer aliphatischen bzw. aromatischen Bismaleinimidverbindung konjugiert ist.

8. Verfahren zur Herstellung der in den Ansprüchen 1, 2, 3, 4, 5 und 7 genannten Chemoimmunokonjugate.

9. Verwendung der in den Ansprüchen 1, 2, 3, 4, 5 und 7 genannten Verbindungen zur Behandlung von Krebskrankheiten.